



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

A FARMACOECONOMIA APLICADA À MEDICINA VETERINÁRIA: ANÁLISE DE CUSTOS  
COMPARADA ENTRE O TRATAMENTO E A VACINAÇÃO DA LEISHMANIOSE CANINA

ANA RITA FERREIRA CASTANHEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles  
Doutora Magda Alexandra Nobre Martins Aguiar de  
Andrade Fontes  
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz  
Dr. Jorge Manuel Baptista Moreira da Silva

ORIENTADOR

Dr. Jorge Manuel Baptista Moreira  
da Silva

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes  
Ferreira São Braz

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

A FARMACOECONOMIA APLICADA À MEDICINA VETERINÁRIA: ANÁLISE DE CUSTOS  
COMPARADA ENTRE O TRATAMENTO E A VACINAÇÃO DA LEISHMANIOSE CANINA

ANA RITA FERREIRA CASTANHEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles  
Doutora Magda Alexandra Nobre Martins Aguiar de  
Andrade Fontes  
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz  
Dr. Jorge Manuel Baptista Moreira da Silva

ORIENTADOR

Dr. Jorge Manuel Baptista Moreira  
da Silva

CO-ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes  
Ferreira São Braz

2013

LISBOA

---

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus Pais, Irmã e Avó pelo apoio e amor incondicionais...por TUDO!!*



## **AGRADECIMENTOS**

À minha co-orientadora, Professora Doutora Berta São Braz, pela revisão da dissertação e aconselhamento, pela disponibilidade, ajuda e apoio constantes, pela partilha de conhecimentos, pela paciência, carinho e amizade que demonstrou desde sempre. São raros os professores que nos marcam...obrigada por ser a Professora e Amiga que é!

Ao meu orientador, Dr. Jorge Moreira da Silva, pela oportunidade de estágio concedida, pela revisão da dissertação e pelo incentivo e apoio na realização da tese de Mestrado.

À Dra Raquel Domingues, pela experiência, conhecimentos e conselhos partilhados, por toda a dedicação, amizade, apoio e motivação transmitidos. Obrigada por tudo...pelo exemplo de profissionalismo e determinação que és, foi realmente um privilégio poder aprender e trabalhar contigo, quando for 'grande' quero ser como tu!

Ao Dr. Francisco Ferraz, por todo o apoio, conselhos sábios e conhecimentos transmitidos.

A toda a restante família Virbac de Portugal Laboratórios, Lda. pela simpatia, boa disposição e disponibilidade com que me receberam durante o período de estágio.

Aos meus pais, irmã e avó, por todo o apoio, dedicação e amor incondicionais, pela educação, valores, força e motivação transmitidos e por sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado.

A toda a família 'DiVet', pela amizade, companheirismo e união, pelas experiências, risadas e bons momentos partilhados, sem vocês não teria sido tão especial e inesquecível.

Aos restantes familiares, amigos e colegas.

A ti Di, por tudo o que és para mim.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização de todo o meu trabalho e percurso académico...um enorme e sincero OBRIGADA!



## **A Farmacoeconomia aplicada à Medicina Veterinária: análise de custos comparada entre o tratamento e a vacinação da Leishmaniose Canina**

### **Resumo**

A relação entre medicamentos e economia é estudada pela farmacoeconomia, que representa uma área da economia da saúde e que, após ser utilizada intuitivamente durante vários anos, emergiu como disciplina no final da década de 1980, devido ao agravamento da crise financeira do setor da saúde e dos custos com medicamentos.

Os estudos farmacoeconómicos abrangem a identificação, o cálculo e a comparação dos custos, riscos e benefícios de terapêuticas específicas, determinando quais são as alternativas que produzem os melhores resultados, face aos recursos utilizados. No contexto atual das práticas sanitárias a temática da avaliação económica tem assumido uma maior relevância, tornando-se num instrumento essencial de apoio à tomada de decisões, a partir de critérios mais eficientes, racionais e objetivos.

Após uma breve abordagem dos princípios e metodologias básicas da farmacoeconomia baseados em fontes da área humana, realizou-se uma análise comparada de custos entre o tratamento e a vacinação da Leishmaniose canina, como exemplo de aplicação na Medicina Veterinária.

A Leishmaniose canina causada por *Leishmania infantum* é uma doença sistémica, de curso crónico e potencialmente fatal, que constitui um grave problema de saúde pública e veterinária.

Após 20 anos de pesquisa está finalmente disponível na Europa a primeira vacina contra a Leishmaniose canina. CaniLeish® reduz quatro vezes o risco de desenvolvimento da doença clínica, conduzindo a um novo nível de proteção de uma forma segura, eficaz e duradoura.

Relativamente ao estudo farmacoeconómico realizado, verificou-se que, para um animal de 20 kg de peso, os custos totais de tratamento com antimoniato de meglumina/alopurinol e miltefosina/alopurinol foram, respetivamente, 3,5 e 3,6 vezes mais caros do que a vacinação com CaniLeish®. Assim, para além do seu importante papel na proteção do animal contra a Leishmaniose, a vacinação com CaniLeish® parece ser mais económica.

**Palavras-chave:** farmacoeconomia, Leishmaniose canina, vacina





## **Pharmacoeconomics applied to Veterinary Medicine: comparative cost analysis between treatment and vaccination of Canine Leishmaniosis**

### **Abstract**

The relationship between drugs and economics is studied by pharmacoeconomics, which represents an area of health economics, which after being used intuitively for several years, emerged as a discipline in the late 1980s, due to the worsening financial crisis in the health sector and drug costs. Pharmacoeconomic studies include identification, calculation and comparison of the costs, risks and benefits of specific therapeutics, determining what are the alternatives that produce the best results on the used resources.

On the current context of health practices, the theme of economic evaluation has assumed a greater relevance, becoming an essential tool to support decision making, based on more efficient, rational and objective criteria.

After a brief overview of the principles and basic methods of pharmacoeconomics based on sources of the human area, a comparative cost analysis between treatment and vaccination of canine Leishmaniosis was made, as an example of application in Veterinary Medicine.

Canine Leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* is a systemic disease with chronic course and potentially fatal, which is a serious public health and veterinary problem.

After 20 years of research, is finally available in Europe the first vaccine against canine Leishmaniosis. CaniLeish® reduces four times the risk of developing clinical disease, leading to a new level of protection in a safe, effective and long lasting manner.

Regarding the pharmacoeconomic study performed, it was found that for an animal with 20 kg the total costs of treatment with meglumine antimoniate/allopurinol and miltefosine/allopurinol were, respectively, 3.5 and 3.6 times more expensive than the CaniLeish® vaccination. Thus, in addition to its important role on the animal's protection against Leishmaniosis, the CaniLeish® seems to be less costly.

**Keywords:** pharmacoeconomics, canine Leishmaniosis, vaccine



## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Índice de Gráficos	xi
Índice de Abreviaturas e Símbolos	xii
Breve descrição das atividades efetuadas durante o Estágio Curricular	xv
I. Farmacoeconomia	1
1. Introdução	1
2. Conceitos e terminologias em Farmacoeconomia	2
3. Tipos de avaliação Farmacoeconómica	4
4. Desenhos metodológicos em Farmacoeconomia	7
5. Aplicações práticas da Farmacoeconomia	9
6. Limitações da análise Farmacoeconómica	10
7. Aplicação da Farmacoeconomia à Medicina Veterinária	11
II. Leishmaniose Canina	13
1. Etiologia	13
2. Vetores biológicos	13
3. Ciclo biológico e Transmissão	14
4. Epidemiologia da Leishmaniose Canina	15
4.1. Epidemiologia da Leishmaniose Canina em Portugal	17
5. Importância em Saúde Pública	18
6. Patogenia e Suscetibilidade	19
6.1. Resposta Imune Celular e Humoral	20
6.1.1. Resposta Imune Celular	20
6.1.2. Resposta Imune Humoral	22
6.2. Patogénese	22
7. Quadro Sintomatológico e Lesional	22
7.1. Lesões cutâneas	23
7.2. Lesões dos órgãos linfoides	24
7.3. Lesões oculares	24
7.4. Lesões renais	25
7.5. Outras lesões	26
8. Diagnóstico	27
8.1. Alterações clínicas laboratoriais	27
8.2. Métodos de Diagnóstico	28
8.2.1. Métodos Parasitológicos	28
8.2.1.1. Métodos Diretos	28
8.2.1.2. Métodos Indiretos	29
8.2.2. Métodos Serológicos	30
8.2.3. Métodos Moleculares	32
9. Tratamento	33
9.1. Tratamento Etiológico	34
9.1.1. Compostos antimoniais	34
9.1.2. Miltefosina	35
9.1.3. Análogos das purinas	36
9.1.4. Anfotericina B	37
9.1.5. Aminosidina	37
9.1.6. Diamidinas	38

9.1.7. Domperidona	38
9.2. Tratamento Sintomático	40
9.3. Seguimento Clínico	40
9.4. Estadiamento e Prognóstico	41
10. Controlo e Profilaxia	42
10.1. Controlo dos Vetores Biológicos	43
10.2. Controlo dos Hospedeiros Reservatórios/ Definitivos	43
10.3. Imunoprofilaxia	45
III. Vacina CaniLeish®	47
1. Enquadramento histórico	47
2. Constituição da vacina	48
2.1. Antigénio: PSE	48
2.2. Adjuvante: QA-21	50
2.3. Excipiente liofilizado: TMS	50
3. Imunologia e Modo de ação	50
4. Estudos de eficácia	53
4.1. Ensaio experimental	53
4.2. Ensaio de campo	54
4.3. Conclusões gerais	56
5. Estudos de segurança	56
5.1. Testes de laboratório: segurança de uma dose extra e sobredosagem	56
5.2. Ensaaios de campo: segurança em várias raças e perceção dos proprietários	57
5.3. Conclusões gerais	58
6. Utilização da CaniLeish® na prática clínica diária	59
6.1. Esquema de vacinação	59
6.2. Requisitos necessários para a utilização correta da vacina	59
6.2.1. Testes serológicos	59
6.2.1.1. IFI e ELISA	60
6.2.1.2. Testes rápidos	61
6.3. Precauções adicionais	61
7. CaniLeish® e a Proteção da Saúde Pública	62
IV. Farmacoeconomia aplicada à Medicina Veterinária: Análise de custo entre o tratamento e a vacinação da Leishmaniose Canina	63
1. Introdução	63
2. Materiais e Métodos	63
3. Resultados e Discussão	64
4. Conclusão	68
V. Bibliografia	71
VI. Anexos	83
Anexo 1 - Comunicação em painel exibida no 12º Congresso Internacional da Associação Europeia de Farmacologia e Toxicologia Veterinária (EAVPT)	83
Anexo 2 - Desenvolvimento do estudo 'Análise de custos comparada entre o tratamento e a vacinação da Leishmaniose Canina'	84
Anexo 3 - <i>Marketing</i> Virbac Leishmaniose/ Informação ao proprietário/ Edição Portugal 2013	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - CaniLeish® liofilizado e solvente para suspensão injetável para cães	48
<b>Figura 2</b> - Composição de cada dose de 1 ml de vacina	48
<b>Figura 3</b> - Mecanismos da resposta imunitária e testes de avaliação aplicados	52
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do modo de ação a desenvolver face aos resultados obtidos mediante IFI ou ELISA	60
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática do modo de ação a desenvolver face a um resultado positivo ou negativo utilizando um teste rápido Speed Leish K™	61

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Avaliações económicas parciais e completas	4
<b>Tabela 2</b> - Resumo das principais diferenças entre os quatro tipos de análise económica completa	7
<b>Tabela 3</b> - Barreiras na utilização das avaliações económicas referenciadas pelos profissionais de saúde	10
<b>Tabela 4</b> - Frequência e parâmetros de monitorização recomendados no tratamento da Leishmaniose Canina	41
<b>Tabela 5</b> - Estadiamento clínico da LCan	42
<b>Tabela 6</b> - Protocolos atuais no tratamento da LCan	64
<b>Tabela 7A</b> - Custos de Vacinação	65
<b>Tabela 7B</b> - Custos de Tratamento	65
<b>Tabela 7C</b> - Rácio Custos Tratamento <i>versus</i> Custos Vacinação	65

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

**Gráficos 1 e 2** – Resultados do estudo de campo

55



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

® - Marca registada  
µg - Micrograma  
µm - Micrómetro  
% - Percentagem  
ADN - Ácido desoxirribonucleico  
ALT - Alanina aminotransferase  
ARN - Ácido ribonucleico  
ASP - Antígeno de Superfície do Parasita  
AVAQ - Anos de Vida Ajustados por Qualidade  
BID - A cada 12 horas  
BVT - *Bio Vêto Test*  
CAMV - Centros de Atendimento Médico-Veterinários  
CD4+ - Linfócitos T *helper*  
CD8+ - Linfócitos T citotóxicos  
cm - Centímetro  
CLWG - *Canine Leishmaniasis Working Group*  
CMH II - Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II  
CMLA - Análise Leishmanicida dos Macrófagos Caninos  
DLA - Sistema do Antígeno do Leucócito Canino  
DTH - Reação de hipersensibilidade do tipo retardado  
EAVPT - Associação Europeia de Farmacologia e Toxicologia Veterinária  
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
ELISpot - *Enzyme Linked ImmunoSpot*  
EMA - *European Medicines Agency*  
EUA - Estados Unidos da América  
FAS - Fosfatase alcalina sérica  
FML - Ligando fucose-manose  
GnRH - Hormona libertadora de gonadotropina  
HE - Hematoxilina-Eosina  
I&D - Investigação e Desenvolvimento  
IECA - Inibidor da enzima de conversão da angiotensina  
IFI - Imunofluorescência indirecta  
IFN-γ - Interferão *gamma*  
Ig - Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
IM - Via intra-muscular  
iNOS - Sintetase induzida do óxido nítrico  
IRC - Insuficiência Renal Crónica  
IRD - *Institut de Recherche pour le Développement*  
IV - Via endovenosa  
kg - Quilograma  
LC - Leishmaniose Cutânea  
LCan - Leishmaniose Canina  
LTT - Teste de Transformação Linfoblástica  
LV - Leishmaniose Visceral ou “Kala-azar”  
m - Metro  
mg - Miligrama  
ml - Mililitro  
mm - Milímetro  
NO - Óxido nítrico  
OIE - *Office International des Epizooties*  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
ONLeish - Observatório Nacional das Leishmanioses

PCR - *Polymerase Chain Reaction* ou Reacção em Cadeia da Polimerase  
PG- prostaglandina  
PO - Via *per os*  
PSE - Proteínas Secretadas-Excretadas  
RCM - Resumo das Características do Medicamento  
RT-PCR - *Real Time-PCR* ou PCR em tempo real  
SID - A cada 24 horas  
SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
SC - Via subcutânea  
Th - Linfócito T *helper*  
Th1 - Linfócitos T *helper* do tipo 1  
Th2 - Linfócitos T *helper* do tipo 2  
TNF- $\alpha$  - Factor de necrose tumoral alfa  
UI - Unidades internacionais  
UPC - Rácio proteína/creatinina urinário  
TMS - Trometamol, Manitol, Sucrose  
VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana  
WHO - *World Health Organization*



## BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES EFETUADAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi efetuado na empresa Virbac de Portugal Laboratórios, Lda. sob orientação do Dr. Jorge Moreira da Silva e acompanhamento da co-orientadora Professora Doutora Berta São Braz. O estágio decorreu oficialmente entre 17 de Outubro de 2011 e 17 de Abril de 2012, sendo posteriormente prolongado até 27 de Maio de 2012.

Fundada no ano de 1968 em França, pelo médico veterinário Dr. Pierre-Richard Dick, a Virbac é o primeiro laboratório mundial dedicado exclusivamente à saúde animal. A empresa posiciona-se no oitavo lugar do *ranking* mundial de companhias farmacêuticas veterinárias tendo obtido um volume de negócios em 2012 de 695 milhões de euros. O grupo desenvolve, fabrica e distribui uma ampla gama de produtos e serviços destinados à prevenção e ao tratamento das principais doenças dos animais de companhia e de produção.

A satisfação das necessidades dos clientes - veterinários, assim como proprietários de animais e profissionais da área de distribuição e agropecuária - é para a Virbac um requisito fulcral da sua atividade em todos os segmentos terapêuticos e em todas as espécies. Assim, a empresa apresenta uma forte orientação para o mercado, pesquisando novas moléculas, criando fórmulas originais a partir de fórmulas já existentes e combinando-as, desenvolvendo medicamentos para combater patologias emergentes mas também para as prevenir, sendo um processo importante de desenvolvimento da companhia.

A Virbac para alcançar um crescimento rentável e sustentável promove ativamente, em todas as suas filiais a nível mundial, os valores sobre os quais foram edificados os seus pontos fortes desde o início: inovação, orientação para o mercado, espírito empreendedor, trabalho em equipa, delegação e responsabilização.

Com uma forte presença internacional, parte integrante da estratégia da Virbac, encontra-se atualmente presente nos cinco continentes e em mais de 100 países. A Virbac de Portugal Laboratórios, Lda. iniciou a sua atividade direta em 2001 apesar da comercialização dos seus produtos ser efetuada em Portugal desde 1990 por outras companhias farmacêuticas.

A escolha do estágio curricular deveu-se ao facto da aluna querer conhecer o papel do médico veterinário e a multiplicidade de funções que pode desempenhar na indústria farmacêutica, área que não é tradicionalmente procurada pelos recém-formados.

Assim, durante o período de estágio houve oportunidade de conhecer o que é a realidade de acção do médico veterinário na indústria farmacêutica através de uma colaboração estreita com os gestores de produto de Animais de Companhia da Virbac, que exercem funções

bastante diversificadas em que são necessários desde conhecimentos técnicos a conhecimentos de *marketing* e gestão.

De entre as principais atividades de estágio realizadas destacam-se: o desenvolvimento de materiais promocionais, estratégias comerciais e campanhas de *marketing*; tradução e adaptação de materiais técnicos e publicitários; análise de produto, das vendas, do mercado; comparação das características, benefício e preços dos produtos com a concorrência; realização das apresentações técnico-científicas para formação e dinamização da Força de Vendas e apoio no lançamento de novos produtos (nomeadamente Endogard®, VeggieDent®, Inflacam® e Vetflurane®).

Houve participação nas reuniões de ciclo, realizadas a cada dois meses com toda a equipa, em que, entre vários assuntos, analisam-se os resultados do bimestre, definem-se estratégias de *marketing* dos diversos produtos, apresentam-se novos produtos e respetivos materiais promocionais e ministra-se formação técnica aos delegados.

A aluna colaborou na preparação, organização, montagem do *stand* Virbac, logística, promoção dos produtos e materiais informativos e receção e esclarecimento de questões dos médicos veterinários no VIII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro realizado no Porto e no XXI Congresso Europeu de Odontologia Veterinária, decorrido em Lisboa.

Também recebeu formação sobre o funcionamento do Sistema de Farmacovigilância da empresa e prestou apoio na elaboração de *Dossiers* de Registo dos produtos da linha dos testes rápidos.

Por fim, foi realizada uma análise económica comparativa entre a prevenção da Leishmaniose através da administração da vacina CaniLeish®, lançada pela Virbac, e o tratamento de um animal com Leishmaniose clínica. A aluna apresentou a comunicação em painel '*Pharmaco-economics: a cost analysis between treatment and vaccination of canine leishmaniosis*' durante o 12º Congresso Internacional da Associação Europeia de Farmacologia e Toxicologia Veterinária (EAVPT) entre os dias 8 e 12 de Julho de 2012, em Noordwijkerhout, Holanda. Este trabalho foi posteriormente publicado no *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Castanheira, Moreira & São Braz, 2012).

Esta foi uma experiência muito enriquecedora, permitindo adquirir novas aptidões e conhecimentos, que contribuiu para um interesse especial pela área farmacêutica.

## **CAPÍTULO I – FARMACOECONOMIA**

A atualidade tem sido demarcada por uma crise económica, que ocorre no país e na Europa, e que originou uma maior consciencialização relativamente aos custos e consequências decorrentes da prática clínica, resultando na atribuição de uma crescente relevância dada à farmacoeconomia. Esta constitui-se num importante instrumento no processo de tomada de decisão, introduzindo entre os profissionais de saúde o conceito de racionalidade económica. Como até à conclusão deste documento se verificou não existir nenhuma menção ao termo ‘farmacoeconomia veterinária’ e partindo do recente conceito de “Um Mundo - Uma só Saúde” (“One World, One Health”), que reconhece a ligação entre a saúde humana, animal e ambiental, a revisão bibliográfica sobre os conceitos farmacoeconómicos essenciais e sua metodologia básica foram baseados em fontes da área humana. Após uma breve exposição desta nova disciplina, e numa tentativa de extrapolação destes conceitos às ciências veterinárias, realizou-se uma análise dos custos de tratamento e de vacinação da Leishmaniose canina, que como já referido resultou na apresentação de uma comunicação em painel no 12º Congresso Internacional da Associação Europeia de Farmacologia e Toxicologia Veterinária (EAVPT) (Anexo 1).

### **1. INTRODUÇÃO**

No contexto das práticas sanitárias, a temática da avaliação económica tem tomado uma posição cada vez mais central e relevante, já que se constata mundialmente que os gastos em saúde crescem a um ritmo acelerado preocupando utentes, governos e sociedade (Tonon, Tomo & Secoli, 2008).

A farmacoeconomia é uma disciplina relativamente recente, e em constante evolução, derivada da economia da saúde. Durante os anos 60, os conceitos de farmacocinética tornaram-se parte integral de educação e de pesquisa e, simultaneamente, a economia da saúde começou a ganhar importância estabelecendo-se como um campo específico de estudo. Na década de 70 emergem os conceitos de custo-benefício e de custo-efetividade. O primeiro livro especializado em economia da saúde é publicado em 1973. Em 1979, Bootman *et al.* realizaram um estudo de custo-benefício sobre a utilização de aminoglicosídeos em pacientes com septicémia. Em 1986, o termo "farmacoeconomia" foi utilizado pela primeira vez por Townsend num fórum público de farmacêuticos no Canadá (DeSanVicente-Célis, Salazar, Pineda-Tamayo & Anaya, 2011).

Os primeiros países em que a autorização da comercialização de novos medicamentos esteve condicionada à apresentação de resultados farmacoeconómicos foram a Austrália seguida do Canadá. Também noutros países, como Portugal, Holanda, Finlândia, Noruega, Reino Unido e Dinamarca a apresentação de estudos farmacoeconómicos é um requisito legal para o registo dos novos medicamentos, como critério complementar da negociação do preço e da comparticipação por entidades públicas (Álvarez, 2001).

Durante os últimos anos, como resultado de vários fatores, a importância da farmacoeconomia tem sido crescente. Os recursos destinados aos cuidados de saúde são limitados em todos os países desenvolvidos, dado que as necessidades da população aumentam a uma taxa maior do que a dos recursos disponíveis. Isto deve-se, basicamente, ao envelhecimento da população (a população idosa consome 4 a 5 vezes mais recursos do que os jovens), ao desenvolvimento de novas tecnologias mais eficazes mas também mais caras, ao aumento das doenças crónico-degenerativas que necessitam de tratamentos mais prolongados e a uma maior procura e acesso da população à saúde. Por estas razões, é essencial racionalizar e priorizar a alocação dos recursos disponíveis para opções com maiores benefícios económicos (Álvarez, 2001).

Neste contexto, os novos fármacos/medicamentos têm que demonstrar a todos os agentes decisores, que vão ser opções terapêuticas com uma melhor relação custo-efetividade, que têm vantagens económicas e/ou qualidade de vida sobre as alternativas existentes e, portanto, vão ajudar a conseguir uma melhor distribuição dos recursos existentes no sistema de saúde (Álvarez, 2001).

Os estudos farmacoeconómicos são um elemento-chave no processo de tomada de decisão relativamente à política de medicamentos, uma vez que irão permitir saber quais as opções mais eficientes, de entre todas as existentes, resultando num maior benefício terapêutico associado a um menor custo (Sacristán, Soto, Reviriego & Galende, 1994).

Assim, a avaliação económica dos medicamentos emerge como um instrumento único para definir se os gastos dos consumidores, das seguradoras e dos governos são compensados por ganhos de saúde, dadas as alternativas de emprego dos recursos disponíveis que existem para o mesmo fim. No setor dos medicamentos, esta abordagem é indispensável já que estes constituem o arsenal terapêutico de primeira linha para a prevenção e tratamento da maioria das doenças e, também, porque em muitos países o seu peso no orçamento da saúde não é desprezível (Despacho do Ministério da Saúde n.º 19 064/99, de 9 de Setembro).

A farmacoeconomia identifica, mede e compara os custos (recursos consumidos) e os resultados (clínicos, económicos e humanísticos) dos medicamentos, das intervenções médicas e serviços farmacêuticos, nos indivíduos, na sociedade e nos sistemas de saúde (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011). De facto, a seleção de uma opção terapêutica considerando simultaneamente os custos e os resultados permite decisões a partir de critérios mais racionais, objetivos e transparentes (Velásquez, 1999).

## **2. CONCEITOS E TERMINOLOGIAS EM FARMACOECONOMIA**

Como os estudos farmacoeconómicos empregam linguagem técnica específica, torna-se conveniente distinguir os termos custos, resultados (*outcomes*), eficácia, efetividade e eficiência, para que possam ser percecionados no contexto em que forem utilizados.

A distribuição dos **custos** é importante para compreender o modo como se organizam os gastos e os recursos em saúde. O custo é o elemento comum dos métodos farmacoeconómicos o qual representa o valor de todos os *inputs* (medicamentos, trabalho, materiais, pessoal, entre outros) e que engloba os recursos considerados relevantes na aplicação do tratamento (Secoli, Padilha, Litvoc & Maeda, 2005). Os custos em saúde podem ser agrupados em várias categorias: diretos (médicos e não médicos), indiretos e intangíveis.

Os custos **diretos** são aqueles diretamente relacionados aos serviços de saúde, dividindo-se em médicos e não médicos. Os custos diretos médicos são os custos incorridos dos produtos e serviços utilizados para prevenir, detetar e/ou tratar uma doença. Exemplos destes custos incluem medicamentos, equipamentos, testes diagnósticos e laboratoriais, hospitalizações e honorários dos profissionais. Os custos diretos não médicos são quaisquer custos resultantes da doença, que não envolvem a compra de serviços médicos, como por exemplo, gastos em transportes, dietas especiais, entre outros (Trask, 2011).

Os **custos indiretos** estão relacionados com a redução da capacidade produtiva do indivíduo, e familiares, resultantes do processo de doença ou de mortalidade precoce, sendo uma importante fonte de consumo de recursos (Trask, 2011). São exemplo destes custos os decorrentes dos dias de trabalho perdidos, da diminuição da produtividade por incapacidade laboral ou da morte prematura devido a doença (Secoli *et al.*, 2005).

Os **custos intangíveis** incluem fatores como dor, ansiedade, redução da qualidade de vida e outras formas de *stress* em pacientes e familiares. Estes custos são de difícil mensuração monetária, sendo geralmente estudados do ponto de vista de qualidade de vida apartir do qual se podem realizar ajustes e cálculos económicos (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011). Os Anos de Vida Ajustados por Qualidade (AVAQ) é um método pelo qual os custos intangíveis podem ser eficazmente integrados em análises farmacoeconómicas (Kulkarni, Dalvi, Moghe & Deshmukh, 2009).

O **outcome** é um termo clássico utilizado em farmacoeconomia que descreve resultados, impactos ou consequências de intervenções de saúde, podendo ser expressos em unidades monetárias, clínicas e humanísticas (Secoli *et al.*, 2005). Os *outcomes* económicos referem-se aos custos e utilização de recursos. Os *outcomes* clínicos são os acontecimentos médicos que ocorrem como resultado de uma doença ou de um tratamento (por exemplo, percentagens de curas obtidas, complicações evitadas, número de vidas salvas, etc). Os *outcomes* humanísticos são as consequências da doença ou do tratamento sobre o estado funcional do paciente ou da qualidade de vida em várias dimensões (por exemplo, a função física, função social, saúde geral, bem-estar e satisfação). A avaliação dos resultados económicos, clínicos e humanísticos, associados a um tratamento alternativo, fornece um modelo completo para a tomada de decisão (Kozma, Reeder & Schulz, 1993).



A **eficácia** e a **efetividade** referem-se aos resultados do medicamento identificados, medidos e valorizados em condições ideais (ensaio clínico controlado) ou reais (durante a comercialização do medicamento), respetivamente. Pode depreender-se que a efetividade de um medicamento está associada às condições decorrentes da prática clínica diária, como por exemplo, a probabilidade de resistência cruzada entre antibióticos ou na falha da adesão ao tratamento, o que implica que a efetividade é frequentemente menor que a eficácia (Mota, 2003; Secoli *et al.*, 2005). A **eficiência** correlaciona os custos e os resultados utilizados em determinada intervenção. Assim, a farmacoeconomia pretende determinar, entre alternativas terapêuticas, qual é a mais eficiente, e qual destas produz os melhores resultados, segundo os recursos investidos (Secoli *et al.*, 2005). De notar que medicamentos eficientes não têm obrigatoriamente de ser os mais baratos, pois será necessário ter em conta os custos incorridos conjuntamente com os benefícios terapêuticos obtidos com a finalidade de determinar qual é a alternativa mais eficiente de todas as disponíveis (Álvarez, 2001).

### 3. TIPOS DE AVALIAÇÃO FARMACOECONÓMICA

O objetivo da avaliação económica é identificar, medir, avaliar e comparar os custos e as consequências das alternativas a serem consideradas (Tabela 1). O tipo de resposta às questões: 'Comparam-se duas ou mais alternativas?' e 'Avaliam-se os custos e as consequências de ambas alternativas?' permite distinguir se é uma avaliação económica parcial ou completa (Trask, 2011).

**Tabela 1** - Avaliações económicas parciais e completas (Adaptado de Marques, 2008)

Avaliam-se os custos e as consequências de ambas alternativas?				
Comparam-se duas ou mais alternativas?	Não	Não		Sim
		Avalia apenas as consequências	Avalia apenas os custos	
		Avaliação Parcial		Avaliação Parcial
		Descrição de consequências	Descrição de custos	Descrição de custos-consequências
	Sim	Avaliação Parcial		Avaliação Completa
		Avaliação de eficácia ou de efetividade	Análise de custos	Análise de custo-efetividade Análise de minimização de custos Análise de custo-benefício Análise de custo-utilidade

**As avaliações económicas parciais** incluem descrições simples dos resultados/consequências ou dos recursos consumidos e, portanto, requerem pouco tempo

e esforço despendidos. Se apenas as consequências ou os custos de um programa, serviço ou tratamento são descritos, a avaliação ilustra uma descrição de consequências ou de custos. Uma análise descrição de custos, ou descrição de consequências, descreve os custos e as consequências de uma alternativa, mas não fornece uma comparação com outras opções de tratamento. Outro exemplo de avaliação parcial é a análise de custo que compara os custos de duas ou mais alternativas sem considerar o resultado (Trask, 2011). As avaliações parciais, apesar de não serem completas, podem representar avaliações intercalares para ajudar a compreender os custos ou as consequências de diferentes estratégias (Ortega, n.d.).

Para que exista uma **avaliação económica completa** devem ser cumpridas duas condições: que se comparem duas ou mais alternativas e que se comparem tanto os custos como os resultados (Ortega, n.d.). Nestes tipos de análise os recursos vão ser sempre quantificados em unidades monetárias, enquanto que os resultados podem ser medidos de diferentes formas, existindo distintos tipos de estudos segundo estes resultados sejam avaliados: custo-efetividade, minimização de custos, custo-benefício e custo-utilidade. Além disto, existe outro tipo de estudo, o estudo de custo da doença com uma especificidade bem definida (Álvarez, 2001). Apesar de as avaliações económicas completas proporcionarem geralmente informações de maior qualidade e utilidade, o tempo, os recursos e o esforço investidos também são consideráveis (Trask, 2011).

Nas análises **custo-efetividade** são comparados os custos e as consequências de terapias ou intervenções alternativas que têm resultados similares (Goldman & Nair, 2007). Neste tipo de análise os benefícios terapêuticos medem-se em unidades físicas ou naturais (como por exemplo: anos de vida ganhos, mortes evitadas, vidas salvas, dias sem dor, mg de triglicéridos diminuídos, entre outros), e os custos em unidades monetárias (Álvarez, 2001). Apesar de ser o método farmacoeconómico que mais se utiliza, a grande desvantagem é a sua limitação em comparar apenas alternativas em que os resultados clínicos avaliados sejam expressos nas mesmas unidades físicas, ou seja, em fármacos pertencentes ao mesmo grupo terapêutico (por exemplo, dois ou mais antibióticos, etc) (Mota, 2003).

A análise com base no método de **minimização de custos** é a forma mais simples de avaliação económica e compara os custos de duas ou mais alternativas cujos resultados clínicos sejam equivalentes, selecionando a alternativa menos dispendiosa (Goldman & Nair, 2007). Um ponto crítico antes de realizar este estudo é a determinação da equivalência, que se pode efetuar a partir da informação de ensaios clínicos controlados ou meta-análise. Este tipo de análise é útil na comparação de medicamentos genéricos equivalentes em resultado, mas distintos no modo de administração e dosagens, como também, na comparação de genéricos com outros medicamentos de marca. A sua principal limitação é a falta de padronização na determinação da equivalência e na dificuldade da interpretação dos ensaios clínicos para esse propósito (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011). De

notar que este método não pode ser usado para avaliar programas ou terapias que conduzam a resultados clínicos diferentes (Kulkarni *et al.*, 2009).

Uma análise **custo-benefício** é utilizada para comparar custos, e consequências, de duas ou mais alternativas com resultados similares ou diferentes (Goldman & Nair, 2007). Neste tipo de estudos, tanto os custos implicados como os resultados clínicos obtidos são medidos em unidades monetárias (Álvarez, 2001). Este tipo de avaliação tem como vantagem permitir comparações de fármacos pertencentes a diferentes grupos terapêuticos (Mota, 2003). Para além disso, permitem eleger a alternativa que apresenta uma melhor relação custo-benefício, apesar de em várias situações ser muito difícil transformar dimensões intangíveis, como por exemplo, o sofrimento e a morte, em unidades monetárias (Álvarez, 2001).

A análise **custo-utilidade** compara os custos e consequências de terapias ou intervenções alternativas, sendo ajustada às preferências, ao nível de satisfação e ao bem-estar do paciente (Goldman & Nair, 2007). No setor da saúde o termo económico 'utilidade' relaciona-se com o bem-estar subjetivo, ou com a perceção individual dos níveis de satisfação em saúde de pacientes que utilizaram determinadas tecnologias sanitárias, incluindo os medicamentos. A medida que usualmente se emprega nesta análise são os Anos de Vida Ajustados por Qualidade (AVAQ), também denominada *Quality-Adjusted Life-Year (QALY)*, que relaciona quantidade (variação na mortalidade) e qualidade de vida (variação na morbilidade) de um paciente (Mota, 2003). Para medir a utilidade utilizam-se escalas de saúde que variam desde o valor 1 (saúde perfeita) até zero (morte) (Álvarez, 2001).

A análise com base no método **custo da doença** quantifica os custos totais atribuíveis a uma doença particular por um período de tempo determinado, fornecendo informações sobre os gastos dos recursos e a distribuição dos custos [diretos, indiretos e intangíveis (em alguns casos)]. Ao identificar com sucesso os custos diretos e indiretos de uma doença, pode-se determinar o valor relativo de um tratamento ou de uma estratégia de prevenção. Por exemplo, determinando o custo de uma dada doença para a sociedade, o custo de uma estratégia de prevenção pode ser subtraído a partir deste obtendo-se, assim, o benefício de implementar esta estratégia em todo o país (Trask, 2011). Existem duas abordagens básicas para o desenvolvimento deste tipo de avaliação: a de incidência, que avalia os custos da doença desde o seu diagnóstico até ao resultado final (mais complexa e cara e, por isso, menos utilizada) e a de prevalência (a mais comum) que mede os custos associados com a doença durante um período de tempo específico, geralmente um ano (Trask, 2011). Esta análise tem dois objetivos principais: mostrar quanto a sociedade gasta numa dada doença e avaliar a verdadeira extensão das consequências socioeconómicas de cada doença para a sociedade e para o sistema de saúde (Álvarez, 2001). Algumas das suas limitações são a não inclusão de informações adicionais e valiosas dadas pelos

estudos de custo-efetividade e custo-benefício. Assim, esta análise não é usada para comparar alternativas de tratamento concorrentes, mas para fornecer uma estimativa do encargo financeiro de uma doença, sendo uma ferramenta útil para determinar o panorama inicial de uma doença, abrindo perspectivas para uma melhor compreensão do seu impacto (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011; Trask, 2011).

Na Tabela 2 resumem-se as principais diferenças encontradas nos estudos de avaliação económica completa.

**Tabela 2** - Resumo das principais diferenças entre os quatro tipos de análise económica completa (Adaptado de Mota, 2003).

<b>Tipo de Avaliação</b>	<b>Medida de Custos</b>	<b>Medida de Resultados</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Limitação</b>
Minimização de custos	Unidades Monetárias	Efeitos iguais	Simplicidade na aplicação	N.º reduzido de terapias com efeitos similares
Custo-efetividade	Unidades Monetárias	Unidades clínicas	Unidades dos efeitos são utilizadas na prática clínica diária	Comparação entre alternativas onde os resultados são expressos nas mesmas unidades físicas
Custo-utilidade	Unidades Monetárias	AVAQ	Permite a integração dos efeitos num único valor de utilidade	Problemas de validade nos instrumentos de medida da utilidade
Custo-benefício	Unidades Monetárias	Unidades Monetárias	Permite comparar diferentes tipos de alternativas farmacológicas	Dificuldade de converter resultados de saúde em unidades monetárias

Legenda: AVAQ, Anos de Vida Ajustados por Qualidade.

#### 4. DESENHOS METODOLÓGICOS EM FARMACOECONOMIA

Para a correta aplicação dos conceitos farmacoeconómicos é 'ideal' a existência de um grupo multidisciplinar: farmacoeconomistas, epidemiologistas, estatísticos, pessoal de investigação e pessoal treinado na recolha de dados (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011).

Os componentes essenciais dos estudos farmacoeconómicos são a perspetiva, o horizonte temporal, e a análise de custos e resultados, estes últimos já aqui explicados (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011).

A determinação dos custos, e dos resultados, depende da perspetiva do estudo por isso a importância da informação farmacoeconómica irá depender sobre o ponto de vista (do governo, empresa de seguros, hospitais, paciente e familiares, sociedade e sistemas de saúde, entre outros) em que a análise for conduzida (Kazerooni, 2009).

O horizonte temporal refere-se ao período escolhido para a realização do estudo, que depende da finalidade da investigação, podendo variar entre algumas semanas até vários anos.

Para a conceção e desenvolvimento dos estudos farmacoeconómicos existem diferentes opções metodológicas, a saber as análises retrospectiva, prospetiva ou preditiva, cada uma com as suas vantagens e desvantagens (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011).

Os estudos **retrospectivos** compreendem a análise de dados de ensaios clínicos e estudos de '*cohort*' realizados previamente. Para alguns autores é o método ideal de estudo em farmacoeconomia. Geralmente utilizam-se bases de dados (criadas com fins de investigação ou administrativos) ou revêm-se histórias clínicas em busca de variáveis de interesse. Este método tem várias vantagens pois permite conhecer informações de grupos de pacientes que não costumam estar envolvidos em fases de desenvolvimento clínico (crianças, idosos, mulheres grávidas, etc.), possibilita também o estudo de doenças raras podendo-se obter resultados dentro de um tempo e custo razoáveis. Contudo, também existem algumas limitações uma vez que pode não existir informação nas bases de dados ou histórias clínicas, pode haver erros de amostragem e se se analisarem ensaios clínicos já terminados os dados disponíveis sobre custos podem ser parciais ou incompletos (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011). Portanto, com o uso de desenhos retrospectivos, em muitos casos, pode existir a limitação de se poder realizar apenas o estudo farmacoeconómico que melhor se adapte e se ajuste aos dados disponíveis (Álvarez, 2001).

A análise **prospetiva** compreende aspetos económicos como parte adicional de um ensaio clínico ou estritamente de avaliações económicas. Podem ser pouco úteis por serem longos, demorados e caros. Desenvolvem-se através de dois métodos, os estudos observacionais utilizando base de dados ou os ensaios clínicos. Os primeiros têm a vantagem de a sua realização ser rápida e barata e desvantagens relacionadas com a qualidade dos dados e ausência de informação relevante, controlo de erros e inexistência de validações sistemáticas de informação. Dada a sua validade interna, confiabilidade, credibilidade e relevância, os ensaios clínicos em farmacoeconomia usam-se para obter dados de eficiência. De acordo com o rigor do estudo têm o inconveniente de a população incluída poder não representar o conjunto da população, o que iria prejudicar a validade externa. Adicionalmente, nos ensaios clínicos vai medir-se a eficácia e não a efetividade, e não está claro qual deveria ser a melhor maneira de recolher o consumo de recursos durante o seu desenvolvimento. Para reduzir estes problemas utilizam-se ensaios clínicos pragmáticos (naturalísticos) com critérios de inclusão pouco exigentes, procurando relembrar condições habituais e utilização de medicamentos num contexto real (Álvarez, 2001; DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011).

Há situações nas quais é necessário recorrer à elaboração de modelos farmacoeconómicos, o que permitirá realizar projeções do comportamento dos medicamentos uma vez que

atinjam o mercado e se utilizem na prática clínica diária (Álvarez, 2001). Os estudos **preditivos** são cada vez mais empregues, por serem práticos, pouco caros e permitirem obter informação valiosa. As técnicas de modelização baseiam-se em análise de decisão e são as seguintes: árvores de decisão simples (úteis em tratamentos de doenças agudas, com períodos de administração curtos e onde as recidivas e recaídas não sejam previsíveis), modelos de Markov (recomendáveis quando se estudam doenças crónicas com tratamentos longos e onde as recaídas e recidivas sejam previsíveis) e modelos de simulação. Para a sua realização empregam-se dados de diversas fontes (ensaios clínicos, meta-análises, base de dados, histórias clínicas, estudos epidemiológicos, painéis de peritos, etc.). Têm aplicações e vantagens importantes: são úteis em condições de incerteza quando se tem informação preliminar de muitas variáveis; na extrapolação de resultados de ensaios clínicos com períodos curtos de seguimento a períodos mais longos; na inter-relação de variáveis de eficácia e efetividade; na comparação de alternativas quando não existem ensaios clínicos que as tenham comparado e, finalmente, em relacionar dados de eficiência com dados da prática clínica diária. No entanto apresentam desvantagens associadas com a sua facilidade de manipulação e com o risco de introdução de dados ou abordagens tendenciosas (DeSanVicente-Célis *et al.*, 2011).

## **5. APLICAÇÕES PRÁTICAS DA FARMACOECONOMIA**

As aplicações práticas dos estudos farmacoeconómicos podem ser úteis em muitas situações que envolvem a tomada de decisão, como as que a seguir se referem:

- **Decisões em matéria de I&D (Investigação e Desenvolvimento) de uma empresa farmacêutica.**

Atualmente, e devido ao elevado custo associado ao desenvolvimento de um novo produto, as companhias farmacêuticas estão mais focadas em fornecer medicamentos cada vez mais eficientes, eficazes, melhor tolerados e de melhor qualidade. Por este motivo, a indústria farmacêutica realiza cada vez mais, e com maior regularidade, avaliações económicas de medicamentos durante todo o ciclo de vida, tanto durante as fases iniciais do seu desenvolvimento como depois da sua comercialização (Herrera, 2004). Assim, a indústria farmacêutica realiza com grande frequência estudos farmacoeconómicos como suporte nas decisões de investigação e desenvolvimento de novos medicamentos, no apoio à definição de estratégias de *marketing*, à modificação de preços e à incorporação de medicamentos em formulários e recomendações terapêuticas (Secoli *et al.*, 2005).

- **Decisões de fixação de preços**

Os estudos farmacoeconómicos podem indicar se as vantagens económicas de um novo medicamento justificam o seu financiamento, ou contribuir para a negociação do seu

preço, com o intuito de estabelecer o valor terapêutico do medicamento justificando o seu preço no mercado (Herrera & Balbín, 2001; Secoli *et al*, 2005).

- **Apoio na decisão clínica**

Os estudos farmacoeconómicos ajudam a estruturar e a articular sistematicamente e explicitamente toda a informação a considerar quando se toma uma decisão clínica. Estes estudos são importantes no apoio ao desenvolvimento de formulários, protocolos e diretrizes da prática clínica. A implementação de um sistema de formulário terapêutico que tenha em conta o princípio farmacoeconómico é uma das principais estratégias de racionalização farmacoterapêutica hospitalar para avaliar e selecionar as alternativas mais eficientes dos medicamentos, resultando numa melhor utilização dos recursos disponíveis e de um aumento da qualidade do atendimento (Ortega, n.d).

- **Estudos de vigilância pós-comercialização**

Estudos de farmacoeconomia mantêm constantemente atualizados os registos sobre os efeitos dos fármacos na prática clínica diária, permitindo reavaliar a sua eficiência e informar sobre eventuais alterações dos preços, formulários ou recomendações de tratamento (Herrera & Balbín, 2001).

## **6. LIMITAÇÕES DA ANÁLISE FARMACOECONÓMICA**

É prioritário identificar as possíveis barreiras à utilização das avaliações económicas por parte dos clínicos (Tabela 3). As principais razões documentadas pelos profissionais de saúde, e que dificultam a implementação de critérios de eficiência na tomada de decisões, são, principalmente, a falta de formação em farmacoeconomia e a dificuldade em entender este tipo de estudo ou na abordagem frequentemente realizada e que se distancia da prática diária. Outros argumentos que questionam a credibilidade das avaliações económicas são o facto de, na maioria dos casos, os estudos serem financiados pela indústria farmacêutica e também a ideia equívoca de entender as avaliações económicas como ferramentas puramente economizadoras (Díaz, Andrés & Carrera-Huesoc, 2011).

**Tabela 3** - Barreiras na utilização das avaliações económicas referenciadas pelos profissionais de saúde (Adaptado de Díaz, Andrés & Carrera-Huesoc, 2011).

Questões éticas
Existência de outros critérios considerados mais relevantes
Falta de tempo
Pouco conhecimento dos métodos de avaliação
O objetivo real é economizar e não atingir uma maior eficiência
Problemas de fiabilidade dos estudos
Os estudos não abordam os problemas diários

Apesar do facto de grande parte das pesquisas ser financiada pela indústria farmacêutica, a farmacoeconomia ao longo dos tempos tem-se afirmado como ciência e tem vindo a adquirir lugar na literatura internacional com trabalhos incontáveis, sobretudo na área hospitalar (Secoli *et al.*, 2005).

## **7. APLICAÇÃO DA FARMACOECONOMIA À MEDICINA VETERINÁRIA**

Na Medicina Veterinária, a aplicação dos estudos farmacoeconómicos é ainda muito limitada. Como já foi mencionado, ainda não foi encontrada qualquer alusão ao termo ‘farmacoeconomia veterinária’, contudo, este conceito está presente na rotina clínica diária de forma empírica pois: o médico veterinário tem de escolher entre alternativas e avaliar e valorizar as consequências e benefícios destas na saúde dos seus pacientes e recursos existentes e disponíveis por parte do proprietário do animal, na escolha da melhor terapêutica que se adeque à situação identificada (Marques, 2008).

Existem alguns estudos farmacoeconómicos na área do medicamento veterinário, especialmente nas espécies pecuárias, e que a título de exemplo se descrevem a seguir.

Num estudo realizado por Wall, Nelson e Guthmiller (1996) concluiu-se que a administração de fluidoterapia com dextrano 70 em vitelos com diarreia severa não era custo-efetiva.

Outro estudo teve como objetivo determinar o custo-efetividade relativo entre diferentes terapêuticas antiparasitárias: tratamento com ivermectina *versus* tratamento com uma combinação de fenbendazol, permetrina e fentião, em vitelos de engorda. Após a análise dos custos e das consequências (índice de crescimento, características de saúde animal - taxas de morbilidade e mortalidade - e características da carcaça), os autores concluíram que a administração tópica de ivermectina mostrou ser mais custo-efetiva do que a administração de fenbendazol *per os*, e permetrina e fentião topicamente (Guichon *et al.*, 2000).

Realizou-se também um estudo similar em que se comparou o custo-efetividade entre a administração tópica de ivermectina e a administração tópica de fentião em 6883 novilhos de engorda. O peso final, o ganho de peso, o ganho médio diário e o rácio consumo de matéria seca/ganho de peso melhoraram significativamente no grupo tratado com ivermectina em comparação com o grupo tratado com fentião. Os resultados deste estudo demonstram que o uso de ivermectina em novilhos de engorda é uma estratégia custo-efetiva, em comparação com o uso de fentião, devido a melhorias significativas no ganho médio diário e no consumo de matéria seca (Schunicht *et al.*, 2000).

Um estudo em frangos sugere que o nicotinato de norfloxacin e a enrofloxacin possuem eficácia clínica similar no tratamento da doença respiratória crónica associada a *E. coli*, e que o nicotinato de norfloxacin apresenta uma melhor relação custo-benefício (Sumano, Ocampo, Brumbaugh & Lizarraga, 1998).



Devido às perdas económicas e produtivas atribuíveis a quistos foliculares, a piómetra e a inatividade ovariana, o objetivo de um estudo realizado por El-Tahawy e Fahmy (2011) consistiu na avaliação do custo de vários fármacos e combinações de fármacos para maximizar a eficiência económica e produtiva na criação de gado leiteiro. Os resultados sugerem que a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) e a oxitetraciclina são a combinação mais custo-efetiva no tratamento de piómetra pós-parto do que a combinação de PGF2 $\alpha$  e cefapirina ou a PGF2 $\alpha$  administrada isoladamente em vacas. Além disso, o tratamento de quistos foliculares, com duas doses de GnRH (do inglês *gonadotropin-releasing hormone*, hormona libertadora de gonadotropina) em intervalos de 7 dias foi mais rentável, e o tratamento de inatividade ovariana pós-parto com GnRH, diminuiu os custos de saúde nos efectivos leiteiros (El-Tahawy & Fahmy, 2011).

O tema farmacoeconomia também mereceu especial destaque na dissertação de Mestrado “O Medicamento Veterinário em Portugal: do registo à comercialização”, em que foram abordados os seus conceitos essenciais e metodologia básica, e em que foi desenvolvida uma *Calculadora dos Custos Diretos da Mamite Clínica*. O objetivo deste estudo parcial farmacoeconómico foi o de calcular os custos económicos diretos da mamite clínica ligeira ou moderada, relacionados com a utilização de vários antimicrobianos para aplicação intramamária (cefalexina, cefoperazona, cefquinoma e amoxicilina + ácido clavulânico + prednisolona), através de distintos protocolos terapêuticos e diferentes níveis de produção (Marques, 2008).

Um exemplo de um estudo farmacoeconómico aplicado, ao setor de animais de companhia, foi a análise de custo-efetividade relativa à utilização de adesivos de fentanil *versus* administração intramuscular de morfina no controlo da dor pós-operatória após rotura do ligamento cruzado anterior e fraturas do membro pélvico, e que foi realizada com 24 cães. Os autores do estudo concluíram que a utilização de adesivos de fentanil não proporcionou uma melhor analgesia em comparação com a administração intramuscular de morfina sendo, simultaneamente, responsável pelo aumento dos custos para os proprietários durante as primeiras 24 horas do pós-operatório (Egger, Glerum, Haag, & Rohrbach, 2007). Assim, para além do apoio à decisão clínica, os estudos farmacoeconómicos também podem ser utilizados como uma ferramenta de informação junto aos clientes e também serem empregues pelos laboratórios farmacêuticos veterinários, numa perspetiva de aprovação e introdução no mercado e de justificação de preços (Marques, 2008).

A farmacoeconomia ainda está num estadio de desenvolvimento na Medicina Veterinária, especulando-se um crescimento desta disciplina nos próximos anos (Chauvin, Madec, Guittet & Sanders, 2002).

## CAPÍTULO II – LEISHMANIOSE CANINA

### 1. ETIOLOGIA

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por um protozoário do género *Leishmania*, pertencente à Família Trypanosomatidae, que afetam o Homem e os animais domésticos e silváticos (Campillo *et al.*, 1999).

*Leishmania infantum* é o agente etiológico da Leishmaniose na região Mediterrânica, sendo o cão o principal reservatório e também o principal hospedeiro do parasita (Moreno & Alvar, 2002). Esta importante zoonose é transmitida por insetos vetores do género *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (América do Norte e do Sul) (Campillo *et al.*, 1999).

Existem cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania* e aproximadamente 20 são responsáveis por doença clínica no Homem (Campillo *et al.*, 1999). O género *Leishmania* divide-se nos sub-géneros *Leishmania* (como por exemplo *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*) e *Viannia* (como por exemplo *L. braziliensis* e *L. peruviana*), de acordo com o local de replicação no inseto vetor (Saridomichelakis, 2009). Os organismos do sub-género *Viannia* desenvolvem-se no intestino posterior, em contraste com a replicação no intestino médio característica das espécies do sub-género *Leishmania* (Greene, 2012).

Como os critérios morfológicos tornam difícil a identificação do parasita são usadas para esse efeito, novas técnicas, que incluem a utilização de iso-enzimas, ácido desoxirribonucleico (ADN), caracterização de anticorpos monoclonais ou análise da membrana estrutural e dos ácidos gordos. A análise electroforética de iso-enzimas, que permite definir zimodemes, é a técnica habitualmente empregue, sendo o zimodeme MON-1 o agente etiológico de Leishmaniose mais comum nos países Mediterrânicos (Roze, 2005; Campino *et al.*, 2006).

### 2. VETORES BIOLÓGICOS

Os vetores responsáveis pela transmissão da infeção são dípteros hematófagos pertencentes à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae. Estes são insetos muito pequenos, silenciosos e ativos ao amanhecer e entardecer, que se caracterizam por terem o corpo e as asas aveludadas e descansarem em formato de 'V' (Roze, 2005; Sharma & Singh, 2008). Apenas as fêmeas são hematófagas enquanto que os machos se alimentam a partir de plantas. As fêmeas necessitam de sangue para obter a proteína essencial para o desenvolvimento dos ovos, alimentando-se principalmente em zonas de pouco pêlo, como por exemplo a cabeça, o nariz, as orelhas e as áreas inguinais e perianais (Sharma & Singh, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os flebótomos adultos são crepusculares e noturnos desde o início da Primavera até final do Outono na bacia do Mediterrâneo e durante todo o ano na América do Sul. Apresentam atividade entre os 15°C e os 18°C, associada a elevada

humidade relativa e ausência de chuva ou vento, podendo percorrer distâncias desde os 200 aos 2500m (Killick-Kendrick, 1999; Sharma & Singh, 2008).

A duração do ciclo biológico no hospedeiro invertebrado varia entre um mínimo de quatro e um máximo de 25 dias, dependendo das condições climáticas externas (Ciaramella & Corona, 2003a; Saridomichelakis, 2009). Em zonas endémicas, e com condições ambientais favoráveis, um cão pode estar sujeito a mais de 100 picadas por hora durante a noite podendo estimar-se que possa receber aproximadamente uma picada infetante por hora. O número de parasitas que são injetados na derme do hospedeiro, após cada picada infetante, pode variar de 100 a 1000, contudo o número crítico necessário para iniciar a infeção permanece desconhecido (Saridomichelakis, 2009).

Nas zonas endémicas do Mediterrâneo os principais vetores de *Leishmania infantum* pertencem ao sub-género *Larroussius* (como, por exemplo, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus* e *Phlebotomus tobbi*) (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Existe uma forte associação entre os flebótomos e as espécies de *Leishmania* transmitidas devido, essencialmente, à atividade enzimática e a ligandos específicos que estão presentes no intestino do inseto que permitem à *Leishmania* permanecer anexada à parede e replicar-se sem ser excretada com a refeição sanguínea ingerida. Consequentemente, a transmissão natural da doença ocorre apenas em áreas em que as espécies vetoras competentes estejam presentes (Killick-Kendrick, 1999; Volf, Hostomska & Rohousova, 2008). A sobrevivência do parasita durante o Inverno (sem ciclo vetorial) é sustentada principalmente em cães infetados, já que não existe evidência de transmissão transovárica no vetor (Bates, 2007). A saliva do flebótomo contém propriedades anticoagulantes, vasodilatadoras e imunomoduladoras que poderão amplificar a infeção por *Leishmania*, estimulando a resposta imunitária Th2 e bloqueando a Th1. Esta ocorrência foi verificada em ratos mas ainda não foi confirmada em cães (Saridomichelakis, 2009).

### 3. CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

*Leishmania* é um parasita difásico que completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, o vetor flebótomo que transmite a forma promastigota extracelular flagelada e o mamífero em que a forma amastigota intracelular se desenvolve. As formas promastigotas finais, os promastigotas metacíclicos, são transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado completando o ciclo de vida de *Leishmania*. Assim, quando o inseto vetor se alimenta do sangue de um vertebrado, inocula promastigotas através da probóscide (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Quando o parasita atinge a derme do hospedeiro inicia-se a fagocitose. Nesta os macrófagos cercam o parasita num vacúolo e tentam eliminá-lo através do metabolismo da cascata de oxigénio, como o ácido nítrico e a libertação de hidrólases lisossomais (Bourdeau, 2009). Neste vacúolo, o parasita perde o flagelo e transforma-se na forma amastigota que aparece como um corpo redondo ou ovóide (tamanho: 1,5 µm a 5 µm)

contendo um núcleo, um cinetoplasto (estrutura mitocondrial contendo ADN) e um remanescente interno do flagelo (Roze, 2005). *Leishmania* evade estas defesas não específicas para sobreviver e se multiplicar no macrófago. Eventualmente, quando o macrófago está repleto de amastigotas rebenta, originando a infecção de mais macrófagos (Alvar, Canavate, Molina, Moreno & Nieto, 2004). Os parasitas podem ser ingeridos por outros flebotomos nos quais os amastigotas são transformados em promastigotas (tamanho: 5-20 µm de comprimento, 1-4 µm de largura). Os promastigotas são injetados juntamente com a saliva na pele do hospedeiro quando o inseto vetor se alimenta novamente. Após inoculação no hospedeiro, os promastigotas perdem o flagelo e transformam-se novamente em amastigotas (Greene, 2012).

Os flebotomíneos são os únicos artrópodes que estão biologicamente adaptados para a transmissão da Leishmaniose (Volf *et al.*, 2008). A proporção relativamente baixa de vetores que albergam *L. infantum* (0,5 - 3%) é suficiente para manter a infecção em áreas endêmicas. Outros modos de transmissão comprovados incluem transfusões sanguíneas provenientes de doadores infetados subclínicamente, e a transmissão vertical e venérea. O processo de seleção de canídeos doadores de sangue assume-se de grande importância na prevenção da infecção por *Leishmania infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Por outro lado, os modos de transmissão suspeitos mas ainda não comprovados compreendem o contato direto através de mordeduras ou feridas - o que poderá explicar a presença de casos clínicos de Leishmaniose Canina (LCan) em áreas não endêmicas na ausência aparente de vetores, como descrito em *Foxhounds* nos EUA ou em cães em algumas áreas na Europa - e transmissão por outros artrópodes hematófagos, tais como carrapatos e pulgas (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Estes modos de transmissão, e vetores alternativos, têm provavelmente pouco significado epidemiológico, pelo menos em regiões onde o inseto vetor estiver presente, e provavelmente desempenham apenas um papel marginal na história natural e epidemiologia das Leishmanioses (Saridomichelakis, 2009).

No Homem a transmissão venérea, as transfusões de sangue, e através de agulhas partilhadas por toxicódependentes, estão descritas como vias alternativas de transmissão (Roze, 2005).

#### **4. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA**

A LCan é endêmica ao longo da bacia do Mediterrâneo, África Oriental, Índia, América do Sul e Central e está a alastrar para áreas não endêmicas no norte da Europa e a emergir no norte da América (Ferroglia, Maroli, Gastaldo, Mignone & Rossi, 2005; Petersen, 2009).

Com base em estudos de seroprevalência efetuados em Espanha, França, Itália e Portugal, estima-se que 2,5 milhões de cães estejam infetados com *L. infantum* e que a infecção se esteja a espalhar para o norte da Europa, atingindo os Alpes, Pirenéus e o noroeste de

Espanha (Moreno & Alvar, 2002). O número de cães infetados na América do Sul é também considerado na casa dos milhões, com altas taxas de infeção relatados em algumas áreas do Brasil e da Venezuela (Werneck *et al.*, 2006).

Na bacia do Mediterrâneo as taxas de seroprevalência encontradas em cães variam entre 10 e 37%. Os estudos, que utilizaram a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a deteção de ADN de *Leishmania* em tecidos caninos, ou combinando serologia e deteção de ADN, revelaram taxas de infeção ainda mais elevadas de cerca de 70% em alguns focos da doença (Baneth, 2010).

A doença pode ser diagnosticada em países não endémicos, como por exemplo a Alemanha e o Reino Unido, em cães que viveram ou viajaram para áreas endémicas, constituindo assim, um problema de saúde veterinária e pública (Shaw *et al.*, 2003). Um estudo na Holanda estimou que 58 mil cães viajam anualmente para o sul da Europa e que o risco de adquirir a infeção é 0,027-0,23% (Teske, van Knapen, Beijer & Slappendel, 2002). Os cães infetados em áreas não-endémicas podem também contribuir para a manutenção do parasita na população canina através de raros, mas possíveis, modos não-vetoriais de transmissão da infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A transmissão de *Leishmania* aos flebótomos foi confirmada em humanos, ratos pretos, gatos domésticos, raposas e gambás, tendo assim o potencial de atuar como reservatórios principais ou secundários (Greene, 2012). No Sul da Europa, os gatos domésticos podem ser hospedeiros secundários de *L. infantum*, o que foi confirmado por infeção experimental e as infeções naturais podem estar associadas aos retrovírus felinos (Ready, 2010).

Em Portugal, a prevalência de *L. infantum*, avaliada com recurso à técnica de imunofluorescência indireta (IFI), foi de 0% em duas amostras de gatos (75 provenientes de Vila Franca de Xira, e 70 provenientes da Área Metropolitana de Lisboa) (Faria, 2008; Rosa, 2009). Noutro trabalho que incluiu 50 felinos domésticos de uma associação particular da Moita (Setúbal), e no qual se utilizou o PCR em tempo real, obteve-se uma prevalência de infeção de 2% (Martins, 2011). Num rastreio epidemiológico da infeção por *Leishmania infantum* em um total de 80 gatos dos distritos de Lisboa e Viseu, 15 (16,8%) animais foram positivos na diluição 1:40 pela técnica de IFI, já pela técnica de PCR em tempo real 8 (11,3%) gatos revelaram resultados positivos (Garrido, 2012). Ramos (2012), recorrendo ao Teste de Aglutinação Direta ou a PCR, obteve como resultado uma prevalência global de infeção por *Leishmania* spp. de 4,6% numa população de 217 felinos provenientes da região de Olhão.

A infeção por *Leishmania infantum* segue frequentemente um padrão insidioso e crónico. Portanto, a LCan é uma doença na qual a infeção não significa doença clínica devido à elevada prevalência de infeções subclínicas (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos em zonas endémicas de LCan, através de técnicas de biologia molecular,

têm mostrado que a prevalência da infecção na população canina por *Leishmania* é consideravelmente mais elevada do que a seroprevalência (Baneth & Aroch, 2008).

Vários fatores predisponentes para o desenvolvimento da doença têm sido descritos, incluindo raça, idade, e genética. Em países como França, Portugal e Grécia as raças suscetíveis incluem o Pastor Alemão, o *Boxer* e o *Doberman*. Já na Grécia e em Espanha raças como o *Collie* e os *Ibizan Hounds*, respetivamente, raramente são infetados. Na Europa a distribuição da doença é considerada bimodal pois a prevalência mais elevada verifica-se em cães com menos de três e mais de oito anos de idade. Relativamente ao género, não se encontra nenhuma predisposição em vários países endémicos, contudo em França foi encontrada uma maior prevalência de LCan em machos tendo-se verificado o mesmo numa área endémica do Brasil (Palatnik-de-Sousa, 2012).

#### **4.1. Epidemiologia da Leishmaniose Canina em Portugal**

Em Portugal o primeiro caso de Leishmaniose Visceral foi relatado numa criança, em Lisboa, no ano de 1910. Esta é a forma clínica observada com maior frequência no nosso país, estimando-se que anualmente sejam diagnosticados cerca de 15 a 20 casos em indivíduos imunocompetentes (Campino *et al.*, 2006; Campino & Maia, 2010).

Atualmente, e à semelhança do que ocorre noutras regiões do Sul da Europa, tem-se verificado um aumento do número de infeções em adultos, especialmente, associados a casos de vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA), embora inicialmente a doença atingisse predominantemente crianças (Campino & Maia, 2010).

A doença foi registada pela primeira vez em cães na área Metropolitana de Lisboa decorria o ano de 1911 (Pereira, 2008). A LCan é endémica em Portugal, mas com níveis regionais variáveis de seropositividade entre 4 e 21% registados no período de 1986 a 2006 (Observatório Nacional das Leishmanioses [ONLeish], 2011). As zonas endémicas situam-se principalmente na região de Trás-os-Montes e Alto Douro, na sub-região da Cova da Beira, no concelho da Lousã, na região de Lisboa e Setúbal, no concelho de Évora e no Algarve. Também se pressupõe que a LCan seja igualmente endémica em outras áreas do Alentejo e do Ribatejo. As maiores prevalências foram registadas nos concelhos de Setúbal (21,3%), Peso da Régua (20,4%), Lisboa (19,2%), Alijó (18,7%) e Mesão Frio (15%). Apesar da existência de regiões endémicas, podem ser observados casos esporádicos de LCan em quase todo o território nacional (ONLeish, 2012).

Faria (2008), num estudo realizado através da técnica IFI detetou que 47,44% (37/78) dos cães observados numa clínica veterinária do município de Vila Franca de Xira tinham anticorpos anti-*Leishmania* enquanto cães de uma associação protetora local apresentaram 46,0% (23/50) de resultados positivos. Noutro estudo realizado em 80 cães assintomáticos na região de Mafra, utilizando a técnica de IFI, detetou-se que 8,75% dos cães testados possuíam anticorpos anti-*Leishmania* (Armés, 2010). Num estudo que incidiu sobre a

população (80 cães) de um canil de Setúbal, e no qual se utilizaram testes comerciais de IFI, foi encontrada uma prevalência de 16,25% (Silva, 2011). Num rastreio, realizado também por IFI, e que incidiu sobre um total de 129 cães assintomáticos pertencentes ao efetivo da Guarda Nacional Republicana, foi possível observar uma prevalência de infeção por *L. infantum* de 1,6% (2/129) (Vidal, 2013).

O número de casos observados tem aumentado e desde 2002 a LCan faz parte do grupo de doenças de notificação obrigatória (Campino & Maia, 2010). Em 2009, e de acordo com um estudo promovido pelo Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish), a Leishmaniose afetava cerca de 6% da população canina, representando 110 mil animais infetados (Campino, 2012).

*Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* são as espécies vetoras comprovadas de *L. infantum* em Portugal com um período de atividade mais intensa de Maio a Outubro. Contudo, devido às alterações climáticas, como por exemplo a elevação da temperatura, poderemos assistir a um aumento destes períodos de transmissão e consequentemente ao aumento da doença (Campino & Maia, 2010; ONLeish, 2012).

## 5. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

A Leishmaniose Humana, causada por várias espécies de *Leishmania*, compreende um grupo de doenças que são principalmente zoonóticas. Estas incluem a Leishmaniose Visceral (LV, também conhecida como *kalaazar*) que envolve órgãos internos, e é fatal se não for tratada, e as formas Cutânea e Mucocutânea (LC), que afetam a pele ou as junções mucocutâneas e podem curar espontaneamente, deixando cicatrizes desfigurantes (Murray, Berman, Davies & Saravia, 2005). A seguir à malária e à filariose linfática esta é a terceira principal doença transmitida por vetores. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), a Leishmaniose é considerada endémica em 88 países, afetando 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com mais de 350 milhões de pessoas em risco. A incidência estimada é de 2 milhões de novos casos por ano, 0.5 milhões de LV, e 1.5 milhões de LC. No entanto, estes dados epidemiológicos estão certamente subestimados uma vez que foram publicados pela OMS em 1993 e mantiveram-se inalterados até à atualidade (World Health Organization [WHO], 2012).

No sul da Europa, a Leishmaniose Visceral Humana causada por *L. infantum* é uma zoonose que afeta crianças ou adultos que sofrem de SIDA ou outras condições imunossupressoras (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Ao longo das duas últimas décadas, muitos fatores determinaram o aumento da incidência de LV humana. Entre eles pode-se considerar a distribuição geográfica da LV na Europa, África, América e Ásia, causada pela migração humana transportando cães infetados para áreas onde o inseto vetor específico já estaria presente; a expansão dos *habitats* dos flebotómíneos devido ao aquecimento global;

a urbanização da doença após desflorestação e a frequente co-infecção em indivíduos VIH-positivos (Palatnik-de-Sousa, 2012).

Podem ocorrer dois ciclos epidemiológicos dependendo da presença ou ausência de um reservatório animal:

- o zoonótico, predominantemente associado a *L. infantum* que afeta as Américas, Médio Oriente, Ásia Central, China e o Mediterrâneo, em que o reservatório é o cão;
- o antroponótico, causado por *L. donovani* que afeta a Índia e a África Central, em que o reservatório é o Homem (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011).

Os cães são considerados o mais importante reservatório da doença para os humanos. Um estudo realizado no Irão mostrou que a posse de um cão infetado é um fator de risco para a infeção humana, estando associada ao aumento do risco da transmissão da infeção devido à percentagem de vetores infetados. No entanto, a presença de um cão infetado numa habitação não parece aumentar muito o risco individual da doença para a família quando a transmissão já está a ocorrer na região, portanto, o perigo para os proprietários de cães com Leishmaniose é mínimo. No sul da Europa, onde a doença humana é frequentemente esporádica, a posse de cães não está geralmente associada com um risco aumentado para a população humana (Gavgani, Mohite, Edrissian, Mohebal, & Davies, 2002; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

## 6. PATOGENIA E SUSCEPTIBILIDADE

A infeção por *Leishmania infantum* em cães apresenta um amplo espectro de respostas imunes e manifestações clínicas que variam desde uma condição clinicamente saudável a doença clínica grave. Estudos realizados em áreas endémicas de Leishmaniose têm demonstrado que uma proporção baixa de canídeos desenvolve a doença, e a outra, infeção subclínica (Solano-Gallego & Baneth, 2008). A progressão da infeção depende da eficácia da resposta imune do hospedeiro (Alvar *et al.*, 2004). Os animais predispostos a desenvolver doença severa são considerados "suscetíveis". Já os cães capazes de controlar a infeção, e de se manterem constantemente subclínicos, são chamados de "cl clinicamente resistentes". No entanto, a infeção subclínica não é necessariamente permanente e fatores, tais como condições de imunossupressão ou doenças concomitantes, poderão quebrar o equilíbrio e levar à progressão da doença clínica em cães, como observado em pacientes humanos com SIDA e co-infetados com *Leishmania* (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

Assim, o resultado da infeção depende de fatores do hospedeiro (genéticos, resposta imune celular ou humoral, nível de citocinas, doenças concomitantes e parasitismo, estado nutricional) e da virulência do parasita. É geralmente aceite que as características genéticas do cão influenciam profundamente a resistência ou a suscetibilidade à LCan (Saridomichelakis, 2009). A implicação de fatores genéticos na LCan é fortemente sugerida pelo *Ibizan Hound*, uma raça que vive num foco endémico, e que raramente desenvolve doença clínica. Esta resistência foi correlacionada com uma resposta celular imunológica



significativa contra *L. infantum* (Barbiéri, 2006). Até agora dois genes foram implicados na suscetibilidade à LCan. Num estudo realizado no Brasil, em cães, sobre a variação genética no Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II (CMH II), chamado de "sistema do Antígeno do Leucócito Canino (DLA)", detetou-se uma associação significativa entre a presença do alelo DLA-DRB1\*01502 e a suscetibilidade à LCan (Quinnell *et al.*, 2003b). Noutro estudo realizado, em Espanha, foram identificados haplótipos do gene canino Slc11a1 (família transportadora do soluto 11 membro a1, antigo gene NRAMP1, que codifica uma proteína transportadora de ferro envolvida no controlo da replicação intrafagossomal de parasitas e ativação de macrófagos) como associados com a suscetibilidade à LCan. Além disso, mutações polimórficas de nucleótidos individuais na região promotora do gene Slc11a1 foram associados com a suscetibilidade à LCan, como também foi descrito em seres humanos, já em *Boxers* o haplótipo (TAG-8-141) foi associado à predisposição para a doença (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008).

### **6.1. Resposta imune celular e humoral**

Na exposição a *Leishmania* é elaborado pelo hospedeiro canino um espectro de respostas imunitárias inatas e adquiridas. Os extremos deste espectro são uma imunidade protetora mediada por células T, estando a suscetibilidade à doença associada a uma marcada resposta humoral não protetora, e a uma diminuição da imunidade mediada por células. Com base em estudos *in vitro* e *in vivo*, sabe-se que os macrófagos desempenham um papel central no controlo da infeção por *Leishmania*. Citoquinas, tais como o Interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), a Interleucina 2 (IL-2) e o Factor de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), secretadas pelas células T ativadas, induzem atividade macrófagica anti-*Leishmania*. O óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos é a principal molécula efetora originando, por apoptose, a morte intracelular de amastigotas (Barbiéri, 2006).

#### **6.1.1. Resposta imune celular**

A imunidade protetora contra parasitas *Leishmania* é mediada pela resposta celular CD4+ T helper1 (Th1). *L. infantum* induz respostas mistas Th1 e Th2, sendo o equilíbrio entre estas dicotomias que irá determinar o controlo da replicação do parasita e a progressão da doença. O conhecimento do perfil de citocinas expressas na LCan é complexo devido ao número limitado de estudos reportados, ao amplo espectro das fases de doença clínica investigadas, aos diferentes tecidos analisados e às diferenças entre a infeção experimental e natural. As células do baço de cães infetados mostraram uma expressão predominante de IL-10 que foi positivamente correlacionada com a carga parasitária e com a gravidade do quadro clínico. A IL-10 é considerada um regulador da atividade de Th1 que mantém o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e inibe a atividade parasiticida dos macrófagos infetados. Estudos experimentais longitudinais da infeção por LCan indicaram

principalmente um padrão misto de tipo Th1 e Th2. A base celular, e os mecanismos envolvidos na ausência de resposta das células T, na LCan ainda não estão totalmente compreendidos. A maioria dos cães infectados são propensos a desenvolver uma imunidade celular positiva expressa como proliferação de linfócitos estimulados *in vitro* por antígenos de *Leishmania* ou *in vivo* através de um teste de pele positivo no início da infecção. No entanto, como a doença progride em cães suscetíveis, estas respostas diminuem. A carga parasitária sanguínea e a imunidade celular mostraram-se inversamente correlacionadas durante um acompanhamento longitudinal de cães infectados experimentalmente. Foi postulado que, a falta de resposta mediada por células na doença progressiva é devida à diminuição do número das células T CD4+ periféricas ou da diminuída expressão de moléculas co-estimulatórias, tais como B7 (Baneth *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de linfócitos CD8+ na resistência à LCan. Estes linfócitos foram detetados em cães assintomáticos, infectados experimentalmente com *L. infantum*, mas não em animais sintomáticos, sugerindo que a lise direta de macrófagos infectados por linfócitos T citotóxicos representa um mecanismo efetor adicional na resistência à doença. Em cães infectados naturalmente com *L. infantum* foi observada uma redução em ambas as células CD4+ e CD8+ tendo ocorrido o restabelecimento destas células após tratamento (Barbiéri, 2006).

A imunidade mediada por células é de suprema importância na defesa contra agentes patogênicos intracelulares tais como *Leishmania* e tem sido estudada através da realização do teste cutâneo de Montenegro e de um ensaio de proliferação de linfócitos em resposta a antígenos dos parasitas. O primeiro é um teste *in vivo* que provoca uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada em indivíduos com uma forte imunidade celular *Leishmania*-específica; os resultados são frequentemente positivos em cães resistentes e negativos, ou fracamente positivos em cães suscetíveis. Do mesmo modo, os linfócitos de cães resistentes podem proliferar *in vitro* em resposta aos antígenos parasitários, enquanto são registadas respostas ausentes ou fracas em animais suscetíveis (Saridomichelakis, 2009).

Na maioria dos estudos, o número de linfócitos CD4+ T-helper (Th) no sangue periférico de cães suscetíveis foi reduzido e inversamente correlacionado com a gravidade da doença, o que conduz à hipótese de que a imunidade mediada por células, pode ser diretamente atribuído a uma falha das células Th. As células T CD8+ foram consideradas essenciais na proteção do hospedeiro, porque podem lisar macrófagos infectados do CMH-II e, talvez, do CMH-I e têm sido correlacionadas com resistência e baixa carga parasitária (Saridomichelakis, 2009).

Os cães com doença grave, ou a progredir para doença, têm níveis elevados de anticorpos, elevada carga parasitária em numerosos tecidos, mas diminuída ou ausente proliferação de linfócitos *Leishmania*-específicos e reação de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH).

Por outro lado, os cães infetados saudáveis (resistentes) produzem linfócitos específicos, reação de DTH forte, níveis variáveis de anticorpos e cargas parasitárias muito baixas, quando comparados com cães doentes ou suscetíveis (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

### **6.1.2. Resposta imune humoral**

A LCan está associada a uma marcada resposta humoral, que não é protetora e é incapaz de controlar a infeção. Os níveis de anticorpos específicos contra *Leishmania* em cães sintomáticos são significativamente maiores do que os encontrados em cães infetados assintomáticos e foi encontrada uma associação significativa entre estes níveis, o estado clínico e a densidade parasitária nos tecidos (Reis *et al.*, 2006). Na tentativa de estabelecer uma correlação entre o nível de subclasse, o tipo de resposta Th e a evolução clínica da infeção os níveis de IgG1 e IgG2 foram estudados extensivamente. Em estudos que avaliaram a IgG1 e IgG2, utilizando anticorpos policlonais, obtiveram-se frequentemente, resultados contraditórios, possivelmente devido a uma falta de especificidade dos reagentes comerciais (Baneth *et al.*, 2008). Além disso, um estudo longitudinal, realizado por Quinnell *et al.* (2003a), demonstrou que as subclasses de IgG não são um marcador útil para o estabelecimento da resistência ou da suscetibilidade da LCan.

### **6.2. Patogénese**

O papel prejudicial da ativação das células B, e da produção excessiva de imunoglobulinas, é exemplificado através da formação de complexos imunes compostos por IgG, IgM e/ou IgA (Saridomichelakis, 2009). Para além disto, os imunocomplexos, constituídos principalmente por IgG e pelas frações C1, C2 e C4 do complemento, desenvolvem-se em diferentes locais do organismo (Alvar *et al.*, 2004). Assim, muitos tecidos e órgãos diferentes estão envolvidos na LCan através de reação inflamatória granulomatosa e/ou de mecanismos imunomediados. A alteração histopatológica típica que ocorre nos tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa associada com a presença de amastigotas de *Leishmania* dentro dos macrófagos (Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009). Por outro lado, os imunocomplexos não só diminuem a atividade fagocitária dos macrófagos, como também agravam a inflamação através da ativação do complemento e têm um papel direto na imunopatologia de vários tecidos e órgãos (Saridomichelakis, 2009). A deposição de complexos imunes circulantes nas paredes dos vasos sanguíneos pode causar vasculite, poliartrite, uveíte, e glomerulonefrite (Greene, 2012). A vasculite é um importante mecanismo patológico responsável pela necrose dos tecidos e por lesões dérmicas, viscerais e oculares encontradas nesta doença (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

## **7. QUADRO SINTOMATOLÓGICO E LESIONAL**

A LCan é uma doença crónica em que os sinais clínicos se podem desenvolver de três meses a sete anos após a infeção (Greene, 2012). As características clínicas da

Leishmaniose variam amplamente sendo, sem dúvida, consequência dos inúmeros mecanismos patogênicos da doença, dos diferentes órgãos afetados e da diversidade de respostas imunes fabricadas pelo hospedeiro (Baneth *et al.*, 2008). As principais alterações clínicas, encontradas com mais frequência no exame clínico, incluem lesões de pele, linfadenomegália local ou generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, letargia, esplenomegália, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistáxis, onicogribose, claudicação, vômitos e diarreia. Os sinais clínicos variáveis e inespecíficos tornam a lista de diagnósticos diferenciais de LCan bastante extensa (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Qualquer órgão pode ser potencialmente envolvido, no entanto alguns sinais clínicos são mais frequentes do que outros (Vulpiani, Iannetti, Paganico, Iannino, & Ferri, 2011). A temperatura corporal pode variar, mas geralmente observa-se temperatura normal ou subfebril. A imunossupressão pode promover a ocorrência de infecções concomitantes, podendo o quadro clínico ser complicado por Demodicose, piodermite ou pneumonia (Ferrer, 1999). O diagnóstico diferencial inclui Demodicose, sarna sarcóptica, dermatite alérgica a picada de pulgas, neoplasia cutânea, dermatite infecciosa e imunomediada, tumor venéreo transmissível, Erliquiose, Babesiose e Rickettsioses (Gomes, Paiva Cavalcanti, Lira, Abath & Alves, 2008).

### **7.1. Lesões Cutâneas**

As lesões cutâneas são as manifestações clínicas mais comuns de LCan, sendo relatadas em mais de 50% dos casos, e até 90% de acordo com vários autores. Tem sido descrita uma extensa variedade de entidades dermatológicas: (1) dermatite exfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia, que pode ser generalizada ou localizada na face, orelhas e membros, (2) dermatite ulcerativa sobre proeminências ósseas, junções mucocutâneas, patas, orelhas, (3) dermatite nodular focal ou multifocal, (4) dermatite mucocutânea proliferativa e (5) dermatite papular (Alvar *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Outras manifestações cutâneas menos frequentes são a despigmentação e hiperqueratose digital e nasal, enquanto que as piodermites, por *Staphylococcus spp.*, são uma complicação frequente (Vulpiani *et al.*, 2011). Num estudo realizado por Semião-Santos *et al.* (1995) a onicogribose foi relatada como presente em 75% dos casos. O sinal mais comum é a alopecia com descamação intensa e seca que geralmente começa na cabeça estendendo-se ao resto do corpo (Ferrer, 1999).

A dermatite exfoliativa, generalizada ou localizada com uma distribuição geralmente simétrica, está presente em 53-73% dos cães com LCan e é clinicamente caracterizada por escamas e xerose, com ou sem hipotricose-alopécia, eritema e hiperpigmentação (Saridomichelakis, 2009). Os sinais típicos de alopecia periorbital bilateral juntamente com onicogribose e perda de peso podem dar aos animais afetados a aparência característica de um 'cão velho' (Ciaramella & Corona, 2003a).

A histopatologia da pele demonstra padrões diferentes: hiperqueratose ortoqueratótica a paraqueratótica, com acantose, crostas e ulceração, dermatite e paniculite. É observada uma inflamação linfoplasmocítica granulomatosa (e/ou piogranulomatosa): perivascular, intersticial, periadnexial (perifolicular), liquenóide, nodular (pode simular adenite sebácea) e/ou difusa. Também têm sido reportadas pústulas intraepidérmicas, foliculite pustular e vasculite necrosante. Além disso, ocorre uma diminuição no colagénio de tipo I e um aumento das fibras de colagénio do tipo III proporcionais à gravidade da lesão da pele e à destruição tecidular. As lesões dérmicas na LCan não são dependentes da resposta inflamatória à presença de *Leishmania*. A pele clinicamente normal também pode albergar um grande número de parasitas, tendo sido encontrada uma carga similar de *Leishmania* em pele com lesões macroscópicas comparativamente a pele de aspeto normal de cães sintomáticos (Bourdeau, 2009).

## **7.2. Lesões dos órgãos linfóides**

A linfadenopatia é um sinal clínico comum, aparecendo em geral relativamente cedo no decurso da doença (Vulpiani *et al.*, 2011). O aumento acentuado dos gânglios linfáticos na LCan é causado por um aumento no número e tamanho dos folículos linfóides e pela marcada hipertrofia e hiperplasia da zona medular dos macrófagos (Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008). A presença deste sinal clínico tem sido relatada em 93,5% dos casos. O aumento geral do seu tamanho facilita a palpação dos linfonodos superficiais, em particular, do poplíteo, pré-escapular e submandibular (Alvar *et al.*, 2004). A esplenomegália é também detetada com frequência sendo causada pela proliferação e/ou infiltração de células imunitárias e pela hiperplasia associada da polpa branca e vermelha como também por alterações da estrutura microvascular (Bourdeau, 2009; Saridomichelakis, 2009).

## **7.3. Lesões oculares**

A prevalência relativa das lesões oculares e perioculares na LCan pode variar de 16% a 80%. As lesões oculares são o único sintoma apresentado em cerca de 15% dos casos clínicos. As manifestações mais comuns são a conjuntivite, blefarite (exfoliativa, ulcerativa ou nodular), uveíte anterior e queratoconjuntivite, comum ou seca (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Na queratoconjuntivite seca os infiltrados inflamatórios, localizados em torno dos canais lacrimais, causam retenção de secreção e uma diminuição da produção lacrimal (Greene, 2012).

As consequências oculares de hipertensão arterial sistémica (exemplo: destacamento da retina e/ou hemorragias, tortuosidade arterial da retina, hifema) são bastante incomuns, e foram relatadas em apenas 5,7% dos cães hipertensos com LCan (Cortadellas, del Palacio, Bayon, Albert & Talavera, 2006).

Lesões do segmento posterior do olho são muito menos comuns do que inflamações no segmento anterior. Sinais oculares raros incluem distrofias corneanas, exoftalmos e

estrabismo. O glaucoma e a panoftalmite são as complicações oculares mais graves da LCan (Roze, 2005).

A histopatologia ocular de 60 casos de LCan revelou uma inflamação linfoplasmocítica a granulomatosa, num padrão perivascular a nodular a difuso, juntamente com a presença do parasita (56,2%) nos tecidos oculares, particularmente na conjuntiva, limbo e corpo ciliar (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Dependendo da lesão, os mecanismos patogénicos subjacentes podem incluir: (1) inflamação granulomatosa secundária à presença do parasita (por exemplo, blefarite, conjuntivite primária, inflamação da glândula lacrimal), (2) deposição de imunocomplexos (uveíte, por exemplo), (3) lesões de outras estruturas oculares (por exemplo, conjuntivite secundária, devido ao envolvimento lacrimal ou palpebral, queratite como uma extensão da conjuntivite, queratoconjuntivite seca devido à inflamação da glândula lacrimal e conjuntivite induzida por obstrução do ducto lacrimal) ou (4) manifestações sistémicas de LCan (por exemplo, descolamento de retina devido à hipertensão arterial sistémica) (Saridomichelakis, 2009).

#### **7.4. Lesões renais**

Em cães doentes a doença renal pode ser a única manifestação clínica da LCan e pode progredir de proteinúria ligeira a síndrome nefrótica ou doença renal terminal. A Insuficiência Renal Crónica (IRC) é uma manifestação grave da progressão da doença e é a principal causa de morte de animais com LCan (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A poliúria ou polidipsia podem indicar lesão renal e muitas vezes são os únicos sinais clínicos da doença (Ciaramella & Corona, 2003a). Apesar da elevada prevalência de patologia renal, a azotémia típica da insuficiência renal é uma alteração laboratorial incomum e apenas se torna evidente quando a maioria dos nefrónios se tornam disfuncionais o que ocorre bastante tarde na progressão da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009). O exame histopatológico renal revela quase sempre lesões de glomerulonefrite (geralmente membranoproliferativa ou mesangioproliferativa) e nefrite túbulo-intersticial e raramente amiloidose. A deposição de imunocomplexos nos glomérulos é a causa da glomerulonefrite, ao passo que as lesões tubulointersticiais surgem secundariamente à patologia glomerular e à inflamação induzida por deposição de imunocomplexos no interstício renal e nas membranas basais tubulares (Saridomichelakis, 2009).

Num estudo realizado em 26 cães com doença renal crónica secundária a Leishmaniose concluiu-se que, os animais proteinúricos e azotémicos ou moderadamente azotémicos apresentaram uma taxa de filtração glomerular reduzida (Cortadellas, del Palacio, Talavera & Bayón, 2008).

O diagnóstico precoce da doença renal é benéfico para o paciente e pode prolongar a sua vida (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

## 7.5. Outras lesões

Como a LCan é uma doença sistêmica, que pode envolver vários órgãos, é possível a ocorrência de uma variedade de outros sinais clínicos que, torna muitas vezes difícil o diagnóstico diferencial (Vulpiani *et al.*, 2011).

Os cães com Leishmaniose podem apresentar sinais de diátese hemorrágica, que se manifesta principalmente como epistáxis, e menos comumente como hematúria e diarreia hemorrágica. A epistáxis, que geralmente é unilateral e intermitente, pode resultar de fatores patogénéticos múltiplos e variáveis envolvidos na hemostase primária e secundária, tal como, trombocitopenia, hiperglobulinemia induzida pela hiperviscosidade do sangue e rinite linfoplasmocitária ou granulomatosa com ou sem ulceração da mucosa nasal (Ciaramella & Corona, 2003a; Greene, 2012). A epistáxis profusa pode ser o único sinal da doença e pode causar morte devido à perda incontrolável de sangue (Miró *et al.*, 2008).

As lesões intestinais estão associadas a uma reação inflamatória piogranulomatosa ou granulomatosa e à presença do parasita, podendo originar diarreia crônica do intestino delgado e/ou grosso, sendo uma alteração clínica rara (Saridomichelakis, 2009).

O envolvimento hepático é muito comum, como sugerem as lesões microscópicas presentes em quase todas as amostras de fígados de animais doentes. Observam-se não só macrófagos infiltrados, mas também células de *Kupffer* residentes e, às vezes, os hepatócitos torna-se infetados. A inflamação granulomatosa crônica, de gravidade variável, pode ser inicialmente restrita aos sinusóides, e depois expandir-se para áreas portais, cápsula ou tornar-se difusa. A hepatomegalia, que é um achado muito mais comum no *pós-mortem* do que no exame físico, é resultante de infiltração de células inflamatórias, de hipertrofia/hiperplasia das células residentes e, possivelmente, de congestão passiva. A patologia hepática contribui para várias anormalidades clinicopatológicas de LCan (por exemplo, hipoalbuminemia e/ou aumento das enzimas hepáticas), mas raramente termina em insuficiência hepática (Saridomichelakis, 2009).

Na LCan é possível observar alguns granulomas localizados no ápice ou no corpo do pênis, petéquias à volta da porção central ou sobre a totalidade da superfície do órgão, e várias equimoses nas mucosas ou sub-mucosas (Pugliese, Di Pietro & Giudice, 2006). O granuloma do pênis, chamado "pênis petequial", é caracterizado pela presença de anéis de cerca de 4 cm de diâmetro, contendo pequenas áreas vermelho-vivo (1 a 2 mm), ricos em amastigotas de *Leishmania* (Ciaramella & Corona, 2003a). Nas fêmeas foram relatados granulomas e pequenos nódulos sub-mucosos no vestíbulo da vagina e na vulva (Pugliese, Di Pietro & Giudice, 2006).

A perda de peso tem sido atribuída à anorexia, à concorrência entre o parasita e o hospedeiro por nutrientes essenciais como o triptofano, a absorção intestinal reduzida e a patologia renal (Saridomichelakis, 2009).

A pneumonia, cuja ocorrência é relativamente rara, é atribuída a deposição de imunocomplexos e infecções secundárias devido a imunossupressão. Podem ocorrer lesões do miocárdio devido a inflamação granulomatosa, deposição de imunocomplexos e hipertensão sistêmica.

O envolvimento do sistema nervoso central é aparentemente raro e pode explicar mudanças de comportamento, convulsões, sinais clínicos sugestivos de meningite e hemorragias espinhais nos quais foram implicados inflamação granulomatosa associada ao parasita, vasculite e deposição de imunocomplexos em meninges (Saridomichelakis, 2009).

Em casos avançados da doença, a diminuição da atividade física é óbvia e está relacionada com sonolência, distúrbios de resistência e locomoção (Ferrer, 1999). Os distúrbios locomotores também podem ser classificados na categoria de observações raras podendo ser causados por neuralgia, poliartrite erosiva e não erosiva, polimiosite, fissuras podais, úlceras interdigitais, lesões osteolíticas e osteoarticulares ou periostite proliferativa (Greene, 2012). A atrofia muscular progressiva está associada com a polimiosite crônica caracterizada pela presença de infiltrados mononucleares de amastigotas de *Leishmania*, vasculite neutrofílica e imunocomplexos de IgG em tecidos musculares conjuntamente com anticorpos anti-miofibras (Miró *et al.*, 2008).

## **8. DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico de LCan é complexo devido ao espectro clínico, e às alterações clínico-patológicas, serem amplas e não específicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). O diagnóstico é normalmente realizado para confirmar a doença num cão com sinais clínicos ou alterações clínico-patológicas compatíveis com LCan. No entanto, a detecção da infecção também pode ser realizada em estudos de investigação, na triagem de cães clinicamente saudáveis que vivem em regiões endêmicas, na prevenção da transmissão por transfusão de sangue, para evitar a importação de cães infetados para países não endêmicos e para monitorizar a resposta ao tratamento (Greene, 2012).

O diagnóstico preciso de LCan requer uma abordagem integrada composta por diagnóstico clínico-patológico e exames laboratoriais específicos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

### **8.1. Alterações clínicas laboratoriais**

As principais alterações clínico-patológicas da LCan são hiperproteinémia, hiperglobulinémia policlonal  $\beta$  e  $\gamma$ , hipoalbuminémia, redução do rácio albumina/globulina, proteinúria leve a grave, azotémia renal, anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopénia e enzimas elevadas. Podem também ser detetadas hiperviscosidade, trombocitopatia, trombocitopénia, hemostasia e fibrinólise secundárias (Solano-Gallego *et al.*, 2009).



## 8.2. Métodos de Diagnóstico

Um teste de diagnóstico eficaz, para além de ser capaz de confirmar uma suspeita clínica num único paciente, bem como de detetar infeção em animais assintomáticos, deve ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples, fácil de executar, não dispendioso, viável em laboratórios regionais e/ou adaptável nas condições de campo. Idealmente, deve detetar todos os cães infetados com *Leishmania*, de preferência utilizando colheita não-invasiva de amostras biológicas (Maia & Campino, 2008).

Atualmente estão disponíveis diferentes métodos de diagnóstico laboratorial, embora não tenham 100% de sensibilidade e especificidade. Estes métodos podem ser divididos em: (a) métodos parasitológicos (deteção do parasita), (b) métodos serológicos (deteção de anticorpos anti-*Leishmania*) e (c) métodos moleculares (amplificação do ADN do parasita) (Ferrer, 1999). É importante compreender a base de cada teste diagnóstico, as suas limitações e a interpretação clínica apropriada (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

### 8.2.1. Métodos Parasitológicos

#### 8.2.1.1. Métodos Diretos

O diagnóstico conclusivo de LCan pode ser feito pela **observação microscópica** de amastigotas de *Leishmania* em esfregaços corados de órgãos/tecidos infetados, nomeadamente, medula óssea, linfonodos, pele ou no sangue periférico (Maia & Campino, 2008). A avaliação de lâminas destes tecidos, coradas com Wright, Giemsa ou Leishman, é ainda o método mais comumente utilizado para a deteção do parasita (Gomes *et al.*, 2008). A técnica, se executada corretamente, é rápida, barata e pouco traumática (Ferrer, 1999). De acordo com Ferrer (1999) e Alvar *et al.* (2004), a observação microscópica de esfregaços de medula óssea e linfonodos tem uma sensibilidade de 60-75% e 30-50%, respetivamente. Podem originar resultados falsos negativos, tanto por causa do número muito baixo de parasitas na medula óssea e gânglios linfáticos, especialmente em cães assintomáticos, ou devido a amostras hemodiluídas (Gomes *et al.*, 2008).

A análise **histológica** de órgãos infetados corados com hematoxilina-eosina (HE) também tem sido utilizada para detetar a presença dos parasitas. No entanto, podem ser necessárias longas observações para se visualizarem os amastigotas já que tais organismos muitas vezes não são facilmente distinguidos. Embora a baixa sensibilidade desta técnica seja reconhecida, Moreira *et al.* (2007) reportaram que em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos o material do linfonodo poplíteo foi o mais eficaz na deteção do parasita (43,9%, 40,0% e 39,13%, respetivamente), seguindo-se amostras do baço e da medula óssea. Embora estes resultados fossem obtidos a partir de amostras colhidas *post-mortem*, na prática clínica têm sido usadas biópsias de linfonodos, medula óssea e pele. Bourdoiseau *et al.* (1997b) avaliaram a coloração HE na demonstração de *Leishmanias* em 34 biópsias

de pele de cães seropositivos e obtiveram uma sensibilidade de 32,35% (Maia & Campino, 2008).

A abordagem **imunohistoquímica**, tal como imunoperoxidase ou imunofluorescência direta de tecidos, pode ser usada como uma ferramenta adicional para confirmar o diagnóstico obtido pela coloração com HE, particularmente em órgãos que não têm carga parasitária elevada. Na análise de amostras de biópsia de pele de regiões anatómicas diferentes, Xavier *et al.* (2006) obtiveram uma maior sensibilidade (62,1%) quando utilizaram a técnica de imunohistoquímica do que quando utilizaram a coloração HE (44,8%). Esta técnica é um complemento útil para confirmar o diagnóstico de LCan quando os parasitas não são claramente identificáveis ao microscópio e quando o padrão histológico indica claramente a doença. É importante ter em consideração que, na observação microscópica a identificação histopatológica e imunohistoquímica de amastigotas requer considerável experiência e treino e pode ser influenciada pela capacidade do observador. Estes métodos também podem originar resultados falso negativos, porque a sua sensibilidade depende da carga parasitária, ou resultados falso positivos, porque outros artefactos vistos por microscopia de luz podem ser erroneamente considerados como amastigotas (Alvar *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008).

#### **8.2.1.2. Métodos Indiretos**

A **cultura *in vitro*** de diferentes tecidos, nos quais a forma infetante do parasita se encontra, pode melhorar a sensibilidade da deteção do mesmo (Maia & Campino, 2008). A cultura de organismos *Leishmania* é o teste mais específico devido ao desenvolvimento de promastigotas viáveis, um estadio flagelado do ciclo de vida, que é exclusivo de *Leishmania* spp. Os meios de culturas utilizados podem ser monofásicos como o meio de inseto de Schneider, M199, RPMI e meio de Grace, ou bifásicos, como o meio Novy-McNeal-Nicolle ou Infusão de Coração e Cérebro. De acordo com Madeira *et al.* (2006) as amostras colhidas de baço, linfonodos e medula óssea são os materiais biológicos com uma taxa mais elevada de culturas positivas. Embora com 100% de especificidade, as culturas são hoje em dia cada vez menos utilizadas no diagnóstico, devido às suas desvantagens, tais como atrasos nos resultados, suscetibilidade à contaminação microbiológica, dependência da carga parasitária e, por vezes, dificuldade em realizar devido à má adaptação do isolado ao meio. Por outro lado, esta metodologia continua a ser necessária para se obter um número suficiente de parasitas para identificação isoenzimática, para utilização como um antígeno para o diagnóstico imunológico, para modelos de infeção experimental, bem como para o rastreio de fármacos *in vitro* ou mesmo identificação molecular (Maia & Campino, 2008).

A presença do parasita pode também ser demonstrada após a **inoculação** de material suspeito no *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*). Embora a inoculação em animais não seja usualmente empregue como um teste de diagnóstico, já que vários meses podem ser

necessários para obter um resultado, pode ser usado com o material clínico recolhido quando existe um risco substancial de contaminação, especialmente em condições de campo (Alvar *et al.*, 2004). Os animais inoculados são examinados semanalmente para detetar sinais de infeção, tais como hepatoesplenomegália (Maia & Campino, 2008).

**O xenodiagnóstico** (alimentação de flebotomíneos, criados em laboratório, em cães infetados, seguido pela deteção de promastigotas de *Leishmania* no vetor) é uma técnica para a deteção e isolamento de agentes patogénicos, que utiliza o seu vetor artrópode natural. Este método raramente é utilizado no diagnóstico de LCan uma vez que só pode ser realizado em laboratórios especializados, onde colónias bem estabelecidas de flebótomos estejam disponíveis (Maia & Campino, 2008). No entanto pode ser uma ferramenta muito útil para o estudo epidemiológico da história natural da LCan (Alvar *et al.*, 2004; Saridomichelakis, 2009).

### 8.2.2. Métodos Serológicos

O diagnóstico de LCan pode ser feito através da deteção de anticorpos específicos (IgG) no soro, estando várias técnicas de diagnóstico disponíveis para o efeito (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em geral, com estes métodos são obtidas boas sensibilidades e especificidades, no entanto, estas características dependem muito dos antígenos utilizados (Maia & Campino, 2008).

Os elevados títulos de anticorpos estão geralmente associados a doença e a uma densidade parasitária elevada (Solano-Gallego & Baneth, 2008), mas alguns cães permanecem seronegativos durante períodos variáveis depois de terem sido infetados por *Leishmania*. A seroconversão ocorre no período de alguns meses desde a infeção, em média 5 meses (intervalo: 1-22) para infeções naturais e 3 meses (intervalo: 1-6) para experimentais (CLWG, 2007). Portanto, um título de anticorpos altamente positivo apoia fortemente o diagnóstico e é conclusivo de LCan com sinais clínicos ou alterações clínico-patológicas compatíveis. Nos casos de títulos baixos de anticorpos e sinais clínicos compatíveis, os métodos adicionais de deteção, tais como a citologia, histopatologia e PCR, orientam a exclusão ou confirmação da doença, porque um resultado positivo de baixo título pode ser detetado em cães que sejam portadores subclínicos (Greene, 2012). Os resultados falso positivos, devido à reatividade cruzada (*Trypanosoma cruzi* ou outras espécies de *Leishmania*), são improváveis na Europa. São menos prováveis de ocorrer quando se utilizam péptidos recombinantes (Bourdeau, 2009).

Vários métodos serológicos têm sido desenvolvidos, incluindo a IFI, a aglutinação direta, a hemaglutinação indireta, a contraimuno-electroforese, a imunocromatografia rápida, os testes de fixação do complemento, vários tipos de ensaios imunoenzimáticos (ELISA, ELISA de competição, Dot- ELISA, slide-ELISA) e o *Western Blot* (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Destes, os mais utilizados são o teste de imunocromatografia rápida, as técnicas de

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e o teste de imunofluorescência indireta (IFI) (Canine Leishmaniasis Working Group [CLWG], 2007).

A IFI é executada através da colocação de soro de animais suspeitos, em série de diluições, em lâminas revestidas com promastigotas de *L. infantum*. A ligação específica do antígeno ao anticorpo, e a concentração relativa (título de anticorpo), são revelados pelo uso de anticorpos conjugados fluorescentes. A avaliação da intensidade de fluorescência por microscopia é subjetiva em títulos baixos positivos, o que é um limite do ensaio. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade este teste é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como método serológico de referência. A titulação de anticorpos por IFI é útil na distinção de cães infectados subclínicos, que geralmente têm títulos baixos e dos animais doentes, que geralmente têm títulos elevados. No entanto, não há consenso entre os laboratórios no limiar do título IFI, o qual pode variar de 1:40 a 1:320 (Gramiccia, 2011). A sensibilidade da IFI na detecção de cães infectados varia entre 21,6% a 100%. Num estudo, em que foram testados cães sintomáticos e assintomáticos de uma área endêmica, a sensibilidade e especificidade foram de 85,5% e 94,7%, respetivamente. Este teste, que utiliza como antígeno o parasita inteiro, é útil em estudos epidemiológicos, na prática clínica e também no seguimento do tratamento (Maia & Campino, 2008).

No diagnóstico por **ELISA**, o soro em avaliação é colocado em microplacas revestidas por antígenos de *Leishmania*. Nos casos positivos ocorre uma reação colorimétrica que pode ser quantificada por espectrofotometria, não sendo dependente de variáveis relacionadas com o operador. Este é um teste específico com uma sensibilidade média-alta (70-100%). No entanto essa sensibilidade e especificidade dependem muito dos antígenos utilizados, que incluem principalmente extratos de promastigota solúveis e proteínas recombinantes ou purificadas (Miró *et al.*, 2008). A utilização de extratos de parasita inteiros aumenta a sensibilidade na detecção de infeções subclínicas ou clínicas, mas com uma especificidade ligeiramente inferior. Por outro lado, o teste ELISA realizado com peptídeos recombinantes é muito específico, mas dependendo do antígeno utilizado, pode faltar sensibilidade na detecção de cães infectados clinicamente saudáveis. Um teste ELISA, baseado em antígenos recombinantes (sub-epítomos K9, K26 e K39), mostrou elevada especificidade e sensibilidade em cães infectados (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os testes ELISA são úteis para análises laboratoriais ou em aplicações de campo e para fazer a triagem de um grande número de amostras num curto período de tempo uma vez que podem ser realizados de forma simples e podem ser facilmente adaptados para o uso com diversos antígenos tais como citoplasmáticos inteiros, antígenos purificados, peptídeos sintéticos definidos e proteínas recombinantes (Maia & Campino, 2008).

Ensaio baseado em **imunocromatografia** são fáceis de usar, com tempos de resposta muito rápidos, permitindo a intervenção imediata do médico veterinário, fornecendo resultados qualitativos no local. Estes testes têm geralmente boa especificidade, mas a sua

sensibilidade é variável e o seu desempenho ainda não é ótimo. Várias apresentações de testes rápidos e preparações antigénicas para IFI e ELISA estão também disponíveis comercialmente (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Embora possuam especificidade média-alta, a sensibilidade pode situar-se entre 30% a 70%, sendo o principal problema a ocorrência de resultados falso-negativos (Oliva *et al.*, 2010).

Os resultados serológicos devem ser sempre correlacionados com características clínicas e alterações laboratoriais antes que seja possível fazer um diagnóstico definitivo da Leishmaniose, uma vez que não tem sido observada nenhuma correlação direta entre títulos serológicos e a severidade dos sinais clínicos. A titulação serológica tem pouco valor como um marcador para a monitorização do tratamento, mas o título negativo no final do tratamento é um indicador valioso, e o reaparecimento de seroconversão é uma indicação precoce de uma recaída (Ciaramella & Corona, 2003a).

Embora a produção de anticorpos seja baixa quer nas fases inicial e tardia, quer em infeções assintomáticas, os cães infetados desenvolvem geralmente títulos de anticorpos que aumentam gradualmente ao longo do tempo (Maia & Campino, 2008). No entanto, a presença apenas de anticorpos anti-*Leishmania* não é um sinal conclusivo de doença. Portanto, é aconselhável realizar mais do que um teste serológico, para melhorar o diagnóstico de LCan e para continuar a monitorização com testagem repetida a cada 3 meses (Maia & Campino, 2008).

### **8.2.3. Métodos Moleculares**

As técnicas moleculares são muito úteis no diagnóstico da Leishmaniose, no seguimento dos pacientes durante e após o tratamento, e na identificação da espécie de parasita (Ferrer, 1999). A deteção, por PCR, do ADN específico do parasita nos tecidos permite um diagnóstico sensível e específico (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A sensibilidade, e especificidade, da técnica de PCR dependem de um número de fatores, que inclui os iniciadores ('*primers*'), o número de cópias do alvo ('*target*'), o método de extração de ADN, o material biológico e o protocolo utilizado. Nos últimos anos, a PCR tem permitido uma considerável melhoria do diagnóstico da LCan, mostrando uma sensibilidade de 89 a 100% em casos sintomáticos ou parasitologicamente confirmados (Alvar *et al.*, 2004). Vários métodos diferentes, com sequências alvo diferentes, utilizando ADN genómico ou cinetoplasto (kADN) foram desenvolvidos para o diagnóstico da LCan. Os ensaios baseados em kADN parecem ser os mais sensíveis na deteção direta em tecidos infetados. A PCR pode ser realizada sobre extratos de ADN de tecidos, sangue, fluidos biológicos ou até mesmo a partir de espécimes histológicos. A análise por PCR de medula óssea, nódulos linfáticos, baço ou pele é muito sensível e específica no diagnóstico da LCan. Já a análise por PCR de sangue total, *buffy coat* e urina é menos sensível do que nos tecidos acima mencionados (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A obtenção de sangue poderia ser o

procedimento mais simples e não invasivo para a realização de PCR, mas a carga parasitária é frequentemente menor do que noutros tecidos (Vulpiani *et al.*, 2011). A amostragem utilizando cotonetes conjuntivais não invasivos provou ser muito sensível e específica na detecção de *L. infantum* em grupos de cães seropositivos com Leishmaniose clínica (Maia & Campino, 2008). A análise por PCR, de aspirados de linfonodos e medula óssea, é mais sensível do que a detecção microscópica de amastigotas em esfregaços corados ou cultura de parasitas (Moreira *et al.*, 2007). Atualmente, estão disponíveis três técnicas diferentes de PCR que são classificadas de acordo com o nível de sensibilidade de menor a maior como PCR convencional, *nested*-PCR e PCR em tempo real (RT-PCR) (Solano-Gallego & Baneth, 2008). A RT-PCR quantitativa é uma técnica avançada que pode detetar cargas parasitárias extremamente baixas quando comparada com o PCR convencional e permite a quantificação das cargas de *Leishmania* em tecidos de animais infetados, sendo importante para o diagnóstico, bem como para o seguimento durante o tratamento de LCan (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A alta sensibilidade do método torna-se uma ferramenta valiosa para detetar a infeção por *Leishmania* em animais assintomáticos (Roze, 2005). É importante salientar que as informações fornecidas pelo PCR não devem ser separadas dos dados obtidos a partir das avaliações clinico-patológicas e serológicas. Estas devem ser combinadas para uma avaliação global (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No entanto, este teste requer equipamento sofisticado e pessoal de laboratório bem treinado, particularmente, para evitar a contaminação da amostra, uma vez que esta técnica é capaz de detetar pequenas quantidades de ADN parasitário. Além disso, este método deteta o ADN amplificado do parasita e não o parasita intato e não reflete a gravidade da infeção ou a fase da doença (Moreira *et al.*, 2007).

## 9. TRATAMENTO

O tratamento da LCan é um desafio para os médicos veterinários. Por causa da sua complexa patogenia, a Leishmaniose pode manifestar-se por diversos sinais clínicos desde ligeiros e não específicos aos que refletem o comprometimento de vários órgãos. O tratamento da LCan é difícil devido à localização intracelular do parasita e ao seu metabolismo, que o protege do sistema imunitário do hospedeiro e da maioria das terapias (Miró *et al.*, 2009). Por isso a resposta imunitária desempenha um papel importante no desenvolvimento, resultado e resposta ao tratamento (Oliva *et al.*, 2010).

Devido ao risco de transmissão, para pessoas e animais de estimação, manter e tratar cães infetados representa um dilema para os proprietários, médicos veterinários e técnicos de saúde pública, especialmente em zonas onde os vetores estão presentes. Embora o tratamento, com os fármacos atualmente disponíveis e utilizados na prática clínica, consiga alcançar com frequência melhoria clínica, os cães tratados permanecem portadores da doença e costumam apresentar recaídas. No entanto, verifica-se que são menos infecciosos para os flebótomos. Para o controlo da LCan e para a redução dos riscos de transmissão de

*L. infantum* é necessário um tratamento adequado. Os proprietários devem receber uma explicação minuciosa e realista sobre a doença, o seu potencial zoonótico, o prognóstico e o que deve ser esperado do tratamento (Solano-Gallego & Baneth, 2008).

## **9.1 Tratamento Etiológico**

### **9.1.1. Compostos antimoniais**

Durante décadas os antimoniais pentavalentes têm sido os principais fármacos usados no tratamento da LCan e humana (Greene, 2012). São exemplos destas substâncias ativas o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) que atuam por inibição seletiva das enzimas da *Leishmania* necessárias para a oxidação dos ácidos gordos e glicólise (Baneth & Shaw, 2002).

O antimoniato de meglumina é a substância ativa, na sua apresentação comercial, mais amplamente utilizada, normalmente combinada com o alopurinol, em diferentes protocolos, que variam consideravelmente em relação à dose, ao intervalo e à duração do tratamento (Vulpiani *et al.*, 2011). Nos canídeos o fármaco tem um tempo de semi-vida curto: 21, 42 e 122 minutos, quando é administrado IV, IM e SC, respetivamente. Cerca de 80% a 95% do antimoniato de meglumina é eliminado através dos rins, nas 6 a 9 horas após a administração, reduzindo assim significativamente a acumulação e toxicidade destes compostos (Noli & Auxilia, 2005; Oliva *et al.*, 2010).

A via preferencial para a administração de compostos antimoniais é a subcutânea, na dose de 75 a 100 mg/kg/dia, durante 4 a 8 semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Greene, 2012). No entanto, estudos farmacocinéticos indicam que uma dose de 75 mg/kg SC duas vezes ao dia pode produzir concentrações plasmáticas superiores (Baneth & Shaw, 2002). A administração intramuscular ou intravenosa, também tem sido sugerida, embora possam causar fibrose muscular, formação de abscessos e tromboflebite (Vulpiani *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos em cães revelou que o fármaco tem boa eficácia clínica. Durante o tratamento a melhoria clínica, juntamente com melhoria nos valores hematológicos e bioquímicos, é geralmente observada após um período de uma ou mais semanas. As recidivas clínicas ocorrem após o tratamento, normalmente num período que varia de meses a 1 ou 2 anos, sendo mais comuns quando a duração do tratamento é inferior a 4 semanas. Um tratamento realizado no início da doença, bem como um manejo adequado das recidivas, podem resultar em 4 anos de sobrevivência em 75% dos cães tratados (Oliva *et al.*, 2010).

A ocorrência de dor e tumefação no local da injeção são os efeitos adversos mais comuns dos compostos antimoniais (Oliva *et al.*, 2010). Outros efeitos adversos possíveis são artralgias, mialgias, distúrbios gastrointestinais, alterações na função hepática e nefrotoxicidade (Alvar *et al.*, 2004). Este último é o efeito mais grave e ocorre principalmente em cães com taxa de filtração glomerular reduzida (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O tratamento com antimoniais, se aplicado como monoterapia por um longo período de tempo, requer administrações diárias que são dolorosas para o animal e é caro para o proprietário (Roze, 2005). O aparecimento de estirpes de *L. infantum* resistentes aos antimoniais pentavalentes tem sido relatado em França, Espanha e Itália e é considerado um problema de saúde veterinária e pública (Greene, 2012). Assim, as limitações destes compostos incluem a seleção de resistência parasitária, toxicidade para o hospedeiro, restrições financeiras devido aos elevados custos do fármaco e ausência de cura completa (Baneth, 2002).

### 9.1.2. Miltefosina

A miltefosina (Milteforan®) é uma alquilfosfocolina que foi desenvolvida como um fármaco antineoplásico em humanos sendo, mais tarde, utilizada no tratamento da Leishmaniose. Foi demonstrado que a miltefosina é estruturalmente semelhante aos compostos metabolizados pela *Leishmania*. O fármaco exerce o seu efeito anti-*Leishmania* atuando sobre as etapas do metabolismo dos fosfolípidos no parasita, sendo capaz de penetrar a membrana celular e causar um rápido e intenso metabolismo dos ésteres fosfolipídicos nas espécies de *Leishmania*. Também interfere nas etapas de comunicação celular e no processo de síntese das membranas celulares do parasita através da inibição da biossíntese de recetores glicosilfosfatidilinositol (essenciais para a sobrevivência intracelular das formas amastigotas do parasita) e quebrando a transdução do sinal da membrana da *Leishmania* através da inibição da fosfolipase C e da proteinoquinase C. Consequentemente a miltefosina induz a morte celular por apoptose. Porém, o fármaco não tem somente ação direta contra as formas promastigotas e amastigotas, pois estimula ainda a ativação de macrófagos e células T e a produção de metabolitos de oxigénio e de NO (Virbac, 2009).

Após ser administrada por via oral, nos cães, a miltefosina é praticamente absorvida na sua totalidade com uma biodisponibilidade absoluta de 94%. O fármaco apresenta tanto uma semi-vida de eliminação lenta (aproximadamente 6,3 dias) como uma depuração plasmática lenta. A miltefosina é apenas parcialmente excretada por via fecal, com cerca de 10% da dose administrada eliminada nas fezes, enquanto que a eliminação dos restantes 90% é realizada através de um lento metabolismo hepático. A contribuição da eliminação do fármaco por via urinária é insignificante (cerca de 0,03%), assim o Milteforan® pode ser administrado em cães com insuficiência renal, sem necessidade de se ajustar a dose normalmente aplicada, constituindo uma mais-valia no tratamento da LCan (RCM Milteforan®, 2007; Virbac, 2009).

A eficácia clínica da miltefosina melhora quando administrada em conjunto com o alopurinol, como iremos referir (Manna *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2009). O protocolo recomendado consiste na administração da miltefosina 2mg/kg/SID PO durante 28 dias (Vulpiani *et al.*,



2011). Durante um período de seguimento de 7 meses em cães tratados com o fármaco, não foram relatadas nem recaídas nem efeitos adversos graves (Miró *et al.*, 2009).

As principais vantagens deste fármaco são a administração oral e a baixa toxicidade, e mesmo que alguns efeitos secundários gastro-intestinais (diarreia, vômitos) tenham sido reportados, principalmente em doses elevadas, é recomendada a administração juntamente com a alimentação (Vulpiani *et al.*, 2011). Além disso, a disponibilidade de um tratamento administrado por via oral, com alimentos, tem um grande potencial para aumentar a adesão dos proprietários à terapêutica (Miró *et al.*, 2009).

Este fármaco está indicado em animais que não perderam o apetite, nem tenham problemas digestivos, sendo a primeira escolha de tratamento em cães com proteinúria e/ou doença renal (Ferrer, 2011). Outro efeito colateral possível poderia ser o desenvolvimento precoce de resistência, devido ao longo tempo de semi-vida deste agente (Vulpiani *et al.*, 2011).

### 9.1.3. Análogos das purinas

O alopurinol é utilizado em Medicina Humana e Veterinária para prevenir a formação de cálculos de urato (Roze, 2005). Trata-se de um análogo estrutural da hipoxantina metabolizado pela *Leishmania spp.* em inosina; esta é incorporada no ácido ribonucleico (ARN) da *Leishmania*, originando tradução proteica defeituosa e inibição da multiplicação do parasita, atuando assim como leishmanioestático (Noli & Auxilia, 2005; Greene, 2012).

O alopurinol deve ser administrado por via oral na dose de 10 mg/kg BID, produzindo com frequência melhoria clínica notável e redução da carga parasitária em 4 semanas. No entanto, quando a terapia é descontinuada, as recaídas ocorrem com frequência.

A tolerância ao fármaco é excelente e têm sido descritos poucos efeitos adversos. O uso de alopurinol causa hiperxantinúria, que pode ocasionalmente produzir urolitíase (Noli & Auxilia, 2005; Greene, 2012).

O alopurinol tornou-se uma parte indispensável do tratamento da LCan usado, com frequência, em combinação com outros fármacos (Greene, 2012). O tratamento combinado com o antimonio de meglumina é considerado como a terapia mais eficaz e é a mais utilizada contra a doença. O protocolo mais comum consiste na administração de antimonio de meglumina numa dose de 100 mg/kg SC, SID durante 1 a 2 meses, em combinação com alopurinol administrado *per os* (PO) a 10 mg/kg BID, durante 6 a 12 meses (Oliva *et al.*, 2010). Esta combinação permite uma redução na duração da terapia com o antimonio de meglumina, tornando-o mais bem tolerado e menos dispendioso. Além disso, a manutenção a longo prazo com o alopurinol tem demonstrado eficácia na manutenção da remissão clínica e na diminuição da taxa de recidivas após tratamento com o composto antimonial (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Shaw & Day, 2005).

Contudo a combinação do alopurinol com a miltefosina tem a mesma eficácia clínica e parasitológica que a combinação do antimonio de meglumina com o alopurinol e tem

mesmo sido sugerida e utilizada em alternativa a esta (Miró *et al.*, 2009). O protocolo, utilizado com sucesso, consiste na administração da miltefosina 2mg/kg/SID PO durante quatro semanas e 10mg/kg/BID PO de alopurinol durante seis meses (Vulpiani *et al.*, 2011). Assim, o alopurinol é amplamente utilizado no tratamento da LCan quer isoladamente (monoterapia) ou em combinação com outros fármacos, devido à sua relativa não toxicidade, à sua eficácia na melhoria da situação clínica, baixo custo e facilidade de administração por via oral (Baneth & Shaw, 2002). Como o produto não é utilizado para o tratamento de Leishmaniose em seres humanos não existe o perigo para a saúde pública de induzir resistência parasitária (Roze, 2005).

#### **9.1.4. Anfotericina B**

A anfotericina B, um macrólide polieno produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, é usada principalmente como fármaco anti-fúngico, mas também tem atividade contra algumas espécies de protozoários, como *Leishmania spp.* Atua ligando-se preferencialmente ao ergosterol das membranas celulares, alterando a permeabilidade destas ao potássio intracelular (Baneth & Shaw, 2002). Foi durante bastante tempo a segunda opção de tratamento "clássico" para a terapia de LCan, sendo um fármaco anti-*Leishmania* muito potente. Contudo, apesar de ser altamente eficaz, a anfotericina B é tóxica e está associada a efeitos adversos graves como, por exemplo, comprometimento da função renal, febre, vômitos e anorexia (Oliva *et al.*, 2010; Vulpiani *et al.*, 2011). O efeito nefrotóxico é devido a vasoconstrição renal e subsequente redução da taxa de filtração glomerular e, possivelmente, também por ação direta nas células epiteliais renais (Shaw & Day, 2005). O protocolo recomendado consiste na administração de doses de 0,1 a 1mg/kg/SID ou duas vezes por semana (doses mais baixas quando a administração é diária) por infusão intravenosa lenta durante dois meses (Vulpiani *et al.*, 2011). O desenvolvimento de formulações de anfotericina B em veículos lipídicos foi realizado para diminuir a toxicidade, mas estes medicamentos têm custos muito elevados. Além disso, estes medicamentos são usados como primeira linha no tratamento da Leishmaniose humana, pelo que a sua utilização em cães não é recomendada para evitar a resistência parasitária (Solano-Gallego *et al.*, 2009). O fármaco é geralmente reservado para pacientes que sejam resistentes a outros fármacos (Ciaramella & Corona, 2003b).

Outros fármacos que não são recomendados na terapia de primeira linha contra a LCan por causa dos efeitos adversos associados com o tratamento incluem a aminosidina e a pentamidina (Greene, 2012).

#### **9.1.5. Aminosidina**

A aminosidina (também chamada de paromomicina) é um antibiótico aminoglicosídico produzido por *Streptomyces rimosus* e tem um mecanismo de ação idêntico contra bactérias

e *Leishmania* pois é capaz de inibir a síntese proteica, interferindo com a ligação dos grupos aminoacilo-transferência ARNs à subunidade ribossomal 30S, e atinge elevadas concentrações intracelulares (Noli & Auxilia, 2005). Tem sido utilizada para o tratamento da LV em humanos em África e na Europa (Baneth & Shaw, 2002).

O fármaco tem sido usado em cães como agente único ou combinado com o antimoniato de meglumina. O protocolo mais comumente utilizado em cães é a aminosidina na dose de 5 mg/kg SC, uma vez por dia durante 3 semanas, associada ao antimoniato de meglumina na dose de 60 mg/kg IM, a cada 12 horas durante 4 semanas (Oliva *et al.*, 2010). A combinação de aminosidina com os antimoniais tem sido relatada como sendo mais eficaz do que a aminosidina em monoterapia (Roze, 2005). Esta associação de fármacos permite melhores resultados clínicos e parasitológicos do que a administração isolada de cada um deles. Uma grande limitação à sua utilização está relacionada com a toxicidade a nível renal e vestibular que demonstra, tal como acontece com outros aminoglicosídeos (Gramiccia & Gradoni, 2005).

#### **9.1.6. Diamidinas**

A pentamidina é um derivado aromático das diamidinas também usado no tratamento da Babesiose, Pneumocistose e Tripanossomíase, bem como da LCan. O seu preciso modo de ação ainda não é conhecido. A atividade leishmanicida do fármaco pode ser medida através da sua influência sobre a biossíntese das poliaminas e do potencial de membrana mitocondrial. A maioria dos cães infetados tratados com pentamidina melhora clinicamente, mas sofre recaídas vários meses após o tratamento (Baneth & Shaw, 2002).

A pentamidina foi usada no tratamento de cães com Leishmaniose durante a década de 1980, mas a administração do medicamento originou efeitos adversos graves, como vômitos, hipersalivação, diarreia, hipotensão arterial e choque anafilático (Rhalem, Sahibi, Lasri, & Jaffe, 1999). Em cães, a pentamidina é usada como alternativa, ou em associação com os compostos antimoniais, embora um efeito sinérgico da combinação dos dois fármacos não tenha sido demonstrado (Roze, 2005).

A administração é realizada por via intramuscular na dose de 4mg/kg duas vezes por semana durante 3-4 semanas (Baneth & Shaw, 2002).

#### **9.1.7. Domperidona**

A domperidona, um antagonista dos recetores D2 da dopamina com propriedades anti-eméticas e gastrocinéticas, provoca a libertação de serotonina, que por sua vez estimula a produção de prolactina (Oliva *et al.*, 2010). A prolactina, atualmente classificada como uma citocina pró-inflamatória derivada do linfócito, estimula a produção de linfócitos Th1 e de IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , levando à ativação dos macrófagos seguida do decréscimo da população de Th2 e TNF- $\beta$  (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

Num estudo realizado por Gómez-Ochoa *et al.* (2009), com 98 cães naturalmente infetados com LCan e tratados unicamente com domperidona na dose de 1 mg/kg PO, BID durante um mês, concluiu-se que esta foi eficaz no controlo e redução dos sinais clínicos e na diminuição do título de anticorpos, não produzindo sinais adversos.

Desde 2012 que se encontra disponível no mercado veterinário nacional o medicamento Leisguard®, cuja substância ativa é a domperidona. De acordo com as indicações de utilização referidas no RCM, o Leisguard® reduz o risco de desenvolvimento de uma infeção ativa e doença clínica após contacto com o parasita, através do aumento da resposta imune com mediação celular, como também controla a progressão clínica da LCan em estados iniciais da doença (animais com níveis de anticorpos positivos baixos a moderados e sinais clínicos ligeiros).

Nos cães em jejum, a domperidona é rapidamente absorvida atingindo um pico plasmático na segunda hora após a administração oral. A semi-vida de eliminação é de 3,2 horas.

Tem excreção fecal e urinária, podendo encontrar-se pequenas quantidades no leite (RCM Leisguard®, 2012).

Não deve ser administrada em casos em que a estimulação da motilidade gástrica possa ser perigosa (por exemplo, em presença de hemorragia gastrointestinal, obstrução mecânica ou perfuração), em animais com tumores da hipófise produtores de prolactina e em casos de insuficiência hepática. Também deve ser administrada com precaução em cadelas com episódios anteriores de pseudo-gestação já que produz um aumento temporário da prolactina plasmática e pode induzir alterações endócrinas como galactorreia (RCM Leisguard®, 2012).

O protocolo instituído é de 1ml/10kg PO, uma vez ao dia durante 4 semanas consecutivas, sendo recomendado um tratamento a cada 4 meses em zonas altamente endémicas (RCM Leisguard®, 2012).

A domperidona tem como vantagens ser um fármaco pouco dispendioso e poder ser administrado por via oral (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

Para além dos fármacos acima mencionados, vários outros fármacos contra LCan foram estudados *in vitro* ou em animais de laboratório, mas raramente em ensaios clínicos controlados. Estes incluem o cetoconazol, metronidazol, espiramicina e marbofloxacin. Estudos clínicos adicionais, em cães naturalmente infetados, são necessários para confirmar o valor terapêutico destes fármacos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

## **9.2. Tratamento sintomático**

A instituição de uma terapêutica sintomática, antes ou em simultâneo com a terapêutica etiológica é uma necessidade e assume vital importância. Deste modo, e de acordo com o caso clínico, poderá ser utilizada antibioterapia de largo espectro de ação, fluidoterapia, administração de anti-inflamatórios, transfusões de sangue e medidas terapêuticas efetivas em caso de insuficiência renal e dietas hipoproteicas (Meireles, 2008).

Na insuficiência renal canina ligeira é aconselhável reduzir a dose, ou mesmo excluir, os fármacos mais nefrotóxicos e administrar uma dieta com baixo teor de sódio, proteína, e fósforo. Nos casos mais graves podem ser administrados aminoácidos e multivitaminas por via oral ou parentérica (Ciaramella & Corona, 2003b).

A administração de IECAS (Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina) ou bloqueadores dos canais de cálcio é sugerida para diminuir a pressão arterial (Roze, 2005). Além do uso controverso de esteróides, a administração de uma adequada fluidoterapia é necessária para corrigir o equilíbrio hidroeletrólítico e estimular a diurese e a excreção de catabolitos azotados (Ciaramella & Corona, 2003b).

Mas os esteróides anabólicos, tais como o decanoato de nandrolona e a metonolona em dosagens de 1 a 2 mg/kg cada sete dias durante 3 a 4 semanas, podem ser usados para reduzir o excessivo catabolismo proteico e estimular a atividade hematopoiética da medula óssea. A anemia também pode ser tratada com o ácido fólico e com a eritropoietina recombinante (100U/kg IV 3 ou 4 vezes) em conjunto com os esteróides anabólicos e vitaminas B (Ciaramella & Corona, 2003b).

Em cães que apresentem piodermites secundárias devem ser administrados antibióticos de largo espectro durante 10 a 15 dias (antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, 20 a 30 mg/kg BID PO ou amoxicilina-ácido clavulânico). Outras patologias cutâneas associadas com a Leishmaniose, como por exemplo sarna sarcóptica e demodécica ou dermatomicose, podem ser tratadas com ivermectina, ésteres fosfóricos, imidazóis e griseofulvina (Ciaramella & Corona, 2003b). A prioridade em casos de lesões intra-oculares inflamatórias é o rápido controlo da inflamação. Deve ser aplicado um tratamento eficaz para a uveíte antes da ocorrência de sinéquias, pois quando estas são generalizadas a progressão para glaucoma é inevitável. Administração de ácido tolfenâmico, em doses de 4 mg/kg em dias alternados, ou outros anti-inflamatórios não esteróides é também eficaz (administração oral não é recomendada). O tratamento anti-inflamatório sistémico deve ser administrado durante vários meses (Roze, 2005). Se a resposta não for considerada como adequada, podem ser usadas doses baixas de prednisolona ou ciclosporina oral (5-10 mg/kg). A utilização da ciclosporina tópica não é eficaz.

### **9.3. Seguimento clínico**

O seguimento dos pacientes, durante e após o tratamento, é tão importante como o tratamento em si. Os objetivos do seguimento clínico são detetar se a resposta é a esperada e se a evolução clínica do animal é a correta; identificar falhas e possíveis efeitos adversos da terapia e corrigi-los; identificar lesões de apresentação tardia associadas com a doença, por exemplo lesões por imunocomplexos, doenças associadas à imunodepressão ou coinfeccções; e por último, detetar, o mais precocemente possível, recidivas da doença (Ferrer, 2011). Assim, o seguimento e monitorização dos parâmetros clínicos e laboratoriais

de cães submetidos a tratamento são essenciais para o manejo adequado da doença (Greene, 2012).

Os parâmetros clínicos a serem monitorizados durante o tratamento dependem do estado de cada animal. Recomenda-se, em geral, a realização do hemograma, do perfil bioquímico e urianálise, incluindo o rácio proteína/creatinina urinário (UPC) nos cães com proteinúria. A frequência de monitorização varia em cada paciente, mas, os parâmetros clínicos devem, na maioria dos casos, ser monitorizados após o primeiro mês de tratamento e depois a cada 3-4 meses. Posteriormente, se o cão estiver clinicamente recuperado com o tratamento, deverá ser recomendada uma reavaliação a cada 6 meses ou uma vez por ano (Tabela 4) (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Mais de 80% dos animais evidenciam uma melhoria clínica durante os primeiros dois meses, e 90% aos 3 meses após o início do tratamento. Os parâmetros clínicos normalizam-se, em geral, aos 3 meses (incluindo o proteinograma). Quanto ao título de anticorpos, embora o título médio tenda a diminuir lentamente nos animais tratados, não se deve esperar seronegativização nos primeiros seis meses de tratamento. Além disso, numa percentagem considerável de animais o título de anticorpos permanece elevado durante anos (Ferrer, 2011).

**Tabela 4** - Frequência e parâmetros de monitorização recomendados no tratamento da Leishmaniose Canina (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Parâmetros	Frequência
História Clínica e Exame Físico Completo Testes Laboratoriais de Rotina: Hemograma Completo, perfil Bioquímico, proteinograma e urianálise incluindo UPC em cães proteinúricos	Após o primeiro mês de tratamento e, em seguida, a cada 3-4 meses durante o primeiro ano. Mais tarde, se o cão estiver totalmente recuperado clinicamente com o tratamento, é recomendável uma reavaliação a cada 6 meses ou uma vez por ano.
Serologia	Após 6 meses do tratamento inicial e depois semestralmente ou anualmente.

Legenda: UPC, rácio proteína/creatinina urinário.

#### 9.4. Estadiamento e Prognóstico

O grupo LeishVet, numa tentativa de cobrir o amplo espectro de manifestações clínicas e graus de severidade característicos da LCan, propôs um sistema de quatro estadios clínicos baseados em sinais clínicos, alterações clínico-patológicas e serologia (Tabela 5) (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Este sistema é útil na decisão da instituição da terapia mais adequada para cada paciente e para a elaboração de um prognóstico. É de notar que o estadio clínico pode ser alterado se a saúde do cão se deteriorar ou melhorar (Greene, 2012).

O prognóstico da LCan depende da gravidade das lesões dos sistemas orgânicos no momento do diagnóstico e da resposta individual do cão e da taxa de deterioração (Greene, 2012).

**Tabela 5** - Estadiamento clínico da LCan (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Estádios	Serologia	Sinais clínicos/ Alterações laboratoriais	Terapia/ Prognóstico
I Doença Ligeira	Negativo a positivo baixo	Sinais clínicos ligeiros (tais como linfadenopatia periférica ou dermatite papular)  Geralmente não são observadas alterações clinicopatológicas Perfil renal normal: creatinina < 1,4 mg/dl; Não proteinúricos: UPC <0,5	Alopurinol ou antimoniato de meglumina ou miltefosina / alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina  Bom
II Doença Moderada	Positivo baixo a positivo elevado	Sinais clínicos do Estadio I + lesões cutâneas difusa ou simétricas (tais como dermatite esfoliativa / onicogribose), ulcerações, anorexia, perda de peso, febre e epistaxis  Alterações clinicopatológicas: anemia não-regenerativa ligeira, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia Sub-estádios: a) o perfil renal normal: creatinina <1,4 mg/dl; Não proteiúricos: UPC <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; UPC = 0,5-1	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina  Bom a reservado
III Doença Grave	Positivo médio a positivo elevado	Sinais clínicos do Estadio II + vasculite, uveíte, artrite e glomerulonefrite  Alterações clinicopatológicas: listado no Estadio II DRC IRIS fase I com UPC> 1 ou fase II creatinina 1,4-2 mg/dl	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina  Seguir as orientações da IRIS para IRC*  Reservado a Mau
IV Doença Muito Grave	Positivo médio a positivo elevado	Sinais clínicos do Estadio III + tromboembolismo pulmonar, ou síndrome nefrótico ou fase final de IRC  Alterações clinicopatológicas: listado no Estadio III IRC IRIS fase III creatinina 2-5 mg/dl) e fase IV creatinina> 5 mg/dl) síndrome nefrótico: proteinúria acentuada UPC> 5	Alopurinol (sozinho)  Seguir as orientações da IRIS para IRC*  Mau

\* IRIS staging of chronic renal disease [[http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging\\_ckd.shtml](http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml)].

Como mencionado anteriormente, não estão disponíveis na literatura protocolos de tratamento que resultem em cura parasitológica. Por conseguinte, se o tratamento for interrompido, a possibilidade de recrudescência da doença é alta, mesmo se a resposta clínica for excelente (Shaw & Day, 2005). Não se deve esquecer que o reconhecimento precoce de uma disfunção renal permite a instituição de uma terapêutica adequada e, potencialmente, um melhor prognóstico.

## 10. CONTROLO E PROFILAXIA

O controlo eficaz da LCan é essencial para a prevenção da doença em humanos já que o cão é o principal hospedeiro reservatório de *Leishmania infantum*, considerando também o bem-estar do animal de estimação. Os esforços para controlar a LCan incluem o tratamento dos cães infetados, o controlo do vetor através do uso de inseticidas, o abate de cães infetados e o desenvolvimento de vacinas caninas (Molina *et al.*, 2012).

### **10.1. Controle dos Vetores Biológicos**

A principal medida de controle do vetor tem sido o uso de inseticidas aplicados tanto no meio ambiente como nos cães (Molina *et al.*, 2012).

A eficácia dos inseticidas ambientais no controle da população de flebótomos tem sido debatida, considerando em especial os elevados custos, as dificuldades de aplicação, as preocupações relativamente ao ambiente, bem como a possibilidade de ocorrência de resistências. A eficácia da pulverização de inseticidas, em particular, foi relatada como sendo mais evidente no ambiente intra ou peridomiciliar, uma vez que este tipo de controle é apenas eficaz em insetos adultos pois desconhece-se o local de habitação das formas imaturas (Alexander & Maroli, 2003). Além disso, a pulverização em áreas como florestas, tocas, cavernas e outros locais onde se suspeita que as larvas e pupas de flebotomíneos vivam é tecnicamente muito difícil, e pode ter efeitos sobre outras espécies de insetos, com consequentes danos ambientais (Alvar *et al.*, 2004).

As medidas de controle adicionais contra os vetores de Leishmaniose, em canis e residências, incluem pulverização, colocação de redes de proteção em janelas e portas e cortinas tratadas com piretróides residuais (Miró *et al.*, 2008).

### **10.2. Controle dos Hospedeiros Reservatórios/ Definitivos**

A prevenção de picadas do inseto vetor é uma ferramenta eficaz na proteção contra a LCan e na redução do risco de infecção no Homem (Maroli *et al.*, 2010). Entre os vários compostos que apresentam um efeito repelente e inseticida, os piretróides sintéticos são os produtos mais utilizados, combinando eficácia contra os flebótomos e a baixa a moderada toxicidade em cães (Gramiccia, 2011). Os ensaios de segurança, realizados em raças pequenas com pele delicada e fina, revelaram reações cutâneas raras e temporárias, incluindo prurido e eritema no local de aplicação (Maroli, Mizzon, Siragusa, D'Oorazi & Gradoni, 2001). Os diferentes medicamentos são distinguidos consoante os diferentes modos de aplicação nos animais e concentração dos piretróides. Assim existem coleiras (deltametrina 4%), unções punctiformes (*spot-on's*) (permetrina 50% + imidacloprida 10% e permetrina 65%) ou em *spray* (permetrina 1,9% + piriproxifeno 0,02%) (Vulpiani *et al.*, 2011).

As coleiras impregnadas com deltametrina libertam gradualmente o inseticida e têm atividade completa uma semana após sua colocação, e se mantidas em condições ótimas podem ter atividade durante seis meses (Gramiccia, 2011). De acordo com diversos estudos, as coleiras demonstraram um efeito protetor de 72% a mais de 90%, e para além disso, um efeito letal compreendido entre 30% a 67% (Maroli *et al.*, 2010). O impacto da utilização, em massa, de coleiras impregnadas com deltametrina na incidência da Leishmaniose em cães na região de Campania, Itália, foi avaliado durante dois períodos de transmissão consecutivos, revelando que as coleiras conferiram 86% de proteção contra a



infecção por *L. infantum* (Maroli *et al.*, 2001). Outro estudo realizado no Irão mostrou que o uso de coleiras pode reduzir significativamente a incidência de LV zoonótica em cães e crianças (Gavgani, Hodjati, Mohite & Davies, 2002).

O tempo de ação decorrente da aplicação tópica de unções punctiformes e *sprays* é menor que o das coleiras. O *spray* tem uma atividade inseticida imediata, que é mantida durante 3-4 semanas (Gramiccia, 2011). As unções punctiformes apresentam a atividade protetora de 24-48h após a aplicação e têm a duração de pelo menos 21 dias. Estas demonstraram ser mais eficazes, com uma taxa de proteção que varia desde 88,9% a 97,7%, chegando mesmo aos 100%, de acordo com os intervalos entre aplicações (uma ou duas vezes por mês). Pelo contrário, o seu efeito inseticida parece não diferir muito daquele atribuído a coleiras, variando entre 23% a 67%. O produto em *spray* utilizado neste estudo mostrou uma eficácia repelente de 71,4%, mas um efeito inseticida apenas de 7,2%, após 21 dias (Maroli *et al.*, 2010).

Os proprietários que planeiem viajar com os seus animais de estimação, de zonas não endémicas para áreas endémicas de Leishmaniose, durante o período de atividade dos flebotómios devem ser aconselhados a ter em consideração que o intervalo de tempo até à proteção total pode variar dependendo do medicamento (Maroli *et al.*, 2010). Devido a uma menor duração da atividade ectoparasiticida, as formulações em unção punctiforme e *spray* exigem aplicações mais frequentes, enquanto as coleiras não precisam ser substituídas mais do que duas vezes por ano em ambientes nos quais os vetores de *Leishmania* são ativos durante todo o ano ou uma vez por ano em áreas temperadas em que os insetos adultos não estão presentes durante os meses frios. Assim, todos os cães saudáveis que vivam ou visitem áreas onde a Leishmaniose é endémica devem ser protegidos de picadas de flebotómios, para evitar infeções (proteção individual). Como os cães que recebem tratamento contra a Leishmaniose continuam a ser infetivos para os vetores, deveria ser recomendável que todos os cães infetados por *Leishmania* que vivem em áreas endémicas sejam protegidos das picadas de flebotómios, como medida para reduzir o risco de infeção na comunidade humana e canina (proteção em massa) (Maroli *et al.*, 2010).

Os médicos veterinários, e os proprietários de cães, são aconselhados a verificar cuidadosamente as recomendações do resumo das características do medicamento (RCM) e a seguir as instruções do fabricante para a correta administração e frequência da mesma. A educação do cliente sobre a manutenção de um inseticida adequado durante todo o período de atividade dos flebótomos na bacia do Mediterrâneo também é crucial para a proteção dos cães (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Outras medidas úteis na prevenção das picadas dos vetores são: 1) a manutenção dos cães dentro de casa do crepúsculo ao amanhecer durante a temporada dos flebótomos; 2) a redução dos *microhabitats* favoráveis aos insetos nas proximidades da casa e em outros

locais onde os cães passem tempo, e 3) a utilização de inseticidas no interior das casas (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

No Brasil, como parte de um programa de controlo, é praticado o abate dos cães seropositivos. Contudo, esta medida parece-nos inaceitável já que os animais de estimação são considerados como parte da família e a sua eficácia no controlo da infeção é controversa. As principais razões para o fracasso do abate canino no Brasil são a alta incidência de infeção e infetividade dos cães para os flebotomíneos, a presença de animais selvagens reservatórios, a insensibilidade dos métodos serológicos na deteção da infeção, a incapacidade de alcançar e testar toda a população canina, o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o abate, bem como a substituição rápida de cães abatidos por novos cachorros suscetíveis (Miró *et al.*, 2008). Assim, a baixa aceitação do abate de animais de companhia pelos seus proprietários, os dilemas éticos de médicos veterinários e razões humanitárias exigem o desenvolvimento de ferramentas preventivas alternativas. A modelação matemática sugere que o controlo do vetor e a vacinação canina seriam mais eficazes do que o abate (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011).

### 10.3. IMUNOPROFILAXIA

A utilização de uma vacina canina anti-*Leishmania* poderá ser o método mais prático e eficaz para o controlo e, eventualmente, erradicação da doença em áreas endémicas (Gradoni, 2001). Várias tentativas para produzir vacinas seguras e eficazes contra a LCan têm tido sucesso muito limitado. Nestas vacinas são utilizados parasitas vivos/mortos (primeira geração), antígenos purificados de *Leishmania* ou bactérias recombinantes que expressem os antígenos de *Leishmania* (segunda geração), bem como vacinas de ADN (terceira geração) (Dantas-Torres, 2006). As vacinas de frações purificadas de *Leishmania* parecem ser as mais bem sucedidas na prevenção da doença (Greene, 2012). Um exemplo desta classe de vacinas é a Leishmune® (Fort Dodge Animal Health) comercializada no Brasil, tendo sido a primeira vacina registrada contra a LCan disponível no mundo inteiro. Esta vacina inclui na sua composição como adjuvante a saponina e uma fração purificada chamada Ligando Fucose Manose (FML), isolada a partir de promastigotas de *L. donovani* (Araújo *et al.*, 2008). Esta vacina provou ser imunogénica, imunoprolática e imunoterapêutica em ratos, *hamsters* e cães, para além de ser segura e apresentar 92-95% de efeito protetor e 76-80% de eficácia vacinal em ensaios de campo realizados no Brasil. Os cães vacinados com Leishmune® mostraram menor exposição dos parasitas aos vetores. Esta vacina comporta-se como bloqueadora da transmissão da infeção, elevando os anticorpos em cães protegidos que assim impedem a ligação da *Leishmania* ao trato intestinal dos flebotomos reduzindo a transmissão da infeção na natureza. Os resultados preliminares de xenodiagnóstico também suportam estas descobertas (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2009). Quando formulada com uma dose dupla de adjuvante de saponina a vacina anti-

*Leishmania* também demonstrou a sua eficácia como agente imunoterápico, utilizado isoladamente ou em associação com o alopurinol e anfotericina B, no tratamento de cães sintomáticos (Borja-Cabrera *et al.*, 2010). Nos locais onde a vacina foi usada houve um impacto sobre a prevalência de infecção, tanto canina como humana, na mesma área, presumivelmente devido ao seu efeito no bloqueio da transmissão do parasita. A distinção entre cães vacinados e infetados é importante num país onde o rastreio serológico e o abate de cães são realizados pelo Ministério da Saúde. Tem sido sugerido que uma identificação incorreta dos animais vacinados levou à relutância dos médicos veterinários no Brasil para utilizar a vacina, e, na realidade, verifica-se que o teste de diagnóstico serológico habitualmente utilizado raramente deteta animais vacinados (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2009).

Outra vacina, denominada Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal SA), também foi licenciada no Brasil, sendo formulada com o adjuvante saponina em conjunto com a versão recombinante do antígeno A2 de amastigotas de *L. donovani* (Day, 2011). Enquanto a proteção com a vacina Leishmune® tem sido amplamente investigada, existe apenas um relatório de um ensaio experimental num canil com Leish-Tec® que foi testada em sete cães e comparada com quatro controlos não tratados. Não há nenhuma informação sobre a infecciosidade da estirpe utilizada e a ausência de mortes dos animais controlo indica que o desafio era ligeiro. Apesar de não existirem relatos de ensaios de campo controlados e da falta de publicações científicas, a vacina foi licenciada no Brasil em 2008 (Palatnik-de-Sousa, 2012).

No primeiro semestre de 2011, foi lançada no nosso país a tão esperada primeira vacina europeia contra a LCan sob o nome de CaniLeish®, tendo sido posteriormente comercializada em Espanha, França, Grécia e Itália (Palatnik-de-Sousa, 2012).

O futuro do controlo da LCan consiste provavelmente numa abordagem integrada que inclui a vacinação eficaz contra *L. infantum* e uso de inseticidas de aplicação tópica (Gramiccia, 2011). A vacina irá impedir o estabelecimento de infecção introduzido pela picada dos flebotómíneos que escapam ao efeito inseticida (Miró *et al.*, 2008).

### **CAPÍTULO III – VACINA CANILEISH®**

#### **1. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO**

O desenvolvimento desta inovadora vacina resultou da colaboração entre as equipas da Bio Véto Test (BVT), do Institut de Recherche pour le Développement (IRD) e das equipas de Investigação e Desenvolvimento (I&D) da Virbac (Virbac, 2011).

No início dos anos 90, o IRD desenvolveu um meio de cultura patenteado e revolucionário, isento de células e de soro, tendo sido concebido de forma a ter as condições necessárias ao desenvolvimento do ciclo de vida completo do parasita *Leishmania*, sem recurso à utilização de animais. Com este novo sistema, para além de se produzirem todos os estadios de desenvolvimento do parasita sem a utilização de animais de experimentação, também se conseguiu obter uma produção significativamente mais rápida do seu ciclo de vida, mantendo-se as propriedades virulentas e antigénicas (Virbac, 2011). E, dada a exclusividade do meio de cultura utilizado, todas as proteínas do sobrenadante são produzidas pela *Leishmania infantum*, designando-se estas por Proteínas Secretadas-Excretadas (PSE) (Lemesre, 1993).

Em 1998, e com o crescente conhecimento dos mecanismos imunológicos da Leishmaniose, a equipa do IRD iniciou a sua colaboração com a BVT, uma companhia especializada em diagnóstico que atualmente é filial da Virbac. Estas decidiram unir esforços para avaliar a utilização potencial dos antígenos PSE de *Leishmania infantum*, inicialmente na criação de provas de diagnóstico e posteriormente na imunoterapia e vacinação profilática de cães. O IRD concedeu à BVT uma licença exclusiva desta patente para aplicações em saúde animal (McGahie, 2011a).

O departamento de I&D da Virbac juntou-se à BVT e à equipa de IRD em 2003, para apoiar este projeto tendo sido efetuado um significativo investimento de conhecimentos, tempo e recursos económicos para melhor definir, aperfeiçoar e desenvolver o produto até ao seu estado atual (Virbac, 2011).

Em 2011 foi finalmente lançada a CaniLeish®, a primeira vacina europeia contra a Leishmaniose que “é até agora o único medicamento veterinário com registo e autorização de introdução no mercado da Agência Europeia do Medicamento (European Medicines Agency (EMA)) para os 27 países da União Europeia para a prevenção da Leishmaniose Canina que visa diretamente o parasita. Sem dúvida um marco de extrema importância na história mais recente da Medicina Veterinária”, sublinha Francisco Ferraz (2012) do Departamento de Marketing da Virbac Portugal Laboratórios, Lda.

Segundo um estudo realizado pela GfK Metris a vacina CaniLeish® foi o medicamento veterinário mais importante lançado nos últimos dois anos (Fonte: Virbac; estudo GfKtrack.2 PETs, 2012).

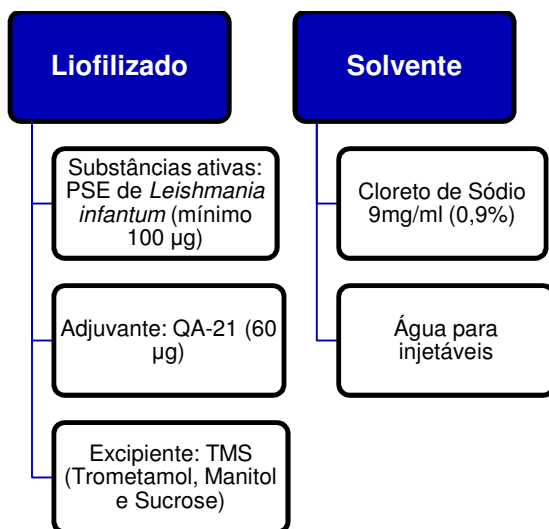
## 2. CONSTITUIÇÃO DA VACINA

A CaniLeish® é uma vacina não-viva, de segunda geração, composta por uma fração proteica específica produzida pelos parasitas. Tecnicamente não é nem uma vacina viva modificada nem uma vacina inativada (bibliografia Virbac). Contudo, de acordo com o sistema de classificação da EMA (2011a) foi inscrita no grupo farmacoterapêutico “vacina parasitária inativada”. A CaniLeish® é constituída por diversos componentes, cada um desempenhando um papel importante na produção e atividade desta nova vacina (Figura 1 e 2).

**Figura 1** - CaniLeish® liofilizado e solvente para suspensão injetável para cães (Fonte: Virbac, 2011).



**Figura 2** - Composição de cada dose de 1 ml de vacina (baseado em EMA, 2011a).



### 2.1. Antígeno: PSE

As PSE são proteínas secretadas-excretadas produzidas por diversos protozoários incluindo *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Babesia*, *Leishmania* e outros (Virbac, 2011). Este grupo de proteínas é importante pois contribui para a infecção da célula e subsequente multiplicação

intracelular pelo parasita, bem como, para a modulação da resposta imunitária do hospedeiro (Rosa, Rodrigues, Marques & Santos-Gomes, 2005). É necessário que o sistema imune possa processar estas proteínas para estimular a proliferação de linfócitos T (Virbac, 2011). Estudos realizados em ratos concluíram que as PSE de *L. infantum* são melhores estimuladores da proliferação de linfócitos T do que extratos do parasita completo (Rosa *et al.*, 2005).

Em contraste com o elevado número (mais de 2000) de proteínas do extrato do parasita completo, na análise das PSE apenas foram identificadas entre 50 a 100 proteínas, tornando a sua caracterização viável e muito menos complexa (Virbac, 2011). Como resultado, constatou-se que uma proporção considerável de proteínas PSE é formada por membros de uma reconhecida família de glicoproteínas: as do Antígeno de Superfície do Parasita (ASP), que já tinham sido definidas como antígenos de superfície de grande interesse em várias publicações (Boceta, Alonso & Jimenez-Ruiz, 2000; Kedzierski *et al.*, 2004; Virbac, 2011). Estas proteínas são expressas na superfície da membrana do parasita nas formas amastigota e promastigota e também são excretadas pela maioria dos membros do género *Leishmania* (Jiménez-Ruiz, Boceta, Bonay, Requena & Alonso, 1998). As ASP estão codificadas em genes altamente conservados entre as diferentes estirpes de *L. infantum*, e também entre as espécies *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* (Devault & Banuls, 2008). Assim, a fração de ASP de PSE é um alvo antigénico conhecido e desejável e está presente em quantidades elevadas, além disso, encontra-se em todas as fases do ciclo de vida e é altamente conservada entre as estirpes do parasita. No entanto, devido à complexidade do parasita é benéfico dispor de uma seleção relativamente ampla de alvos antigénicos, utilizando-se por isso as PSE em vez de se usarem exclusivamente as ASP (Virbac, 2011).

O processo inovador de produção das PSE proporciona uma fonte única e extremamente bem adaptada de antígenos para a vacina CaniLeish® (Virbac, 2011). Os parasitas são cultivados num meio que não contém células nem soro, apenas quantidades precisas de pequenas moléculas como açúcares, aminoácidos e vitaminas necessárias ao seu desenvolvimento e multiplicação. Logo, as PSE do parasita são as únicas proteínas presentes no sobrenadante do meio de cultura (EMA, 2011b). Além disto, e como todas as proteínas são produzidas de forma natural pelos próprios parasitas de *Leishmania* juntamente com as modificações pós-traducionais adequadas tais como a glicosilação, a retenção da conformação original das proteínas é assegurada (Virbac, 2011). Estudos realizados com ASP de *L. major* em ratos concluíram que quando estas proteínas eram expressas pelos próprios parasitas tinham efeito protetor contrariamente ao que sucedia quando eram produzidas por tecnologia recombinante em bactérias *E. coli*, confirmando assim a necessidade de manutenção da conformação original (Sjölander, Baldwin, Curtis, Bengtsson & Handman, 1998). Assim, o processo de produção de CaniLeish®

proporciona uma solução ideal de antígenos que pode ser utilizada para estimular a resposta imune contra todos os estágios do parasita (Virbac, 2011). De referir ainda, que múltiplos e rigorosos patamares de controlo de qualidade, asseguram um consistente perfil proteico da vacina (EMA, 2011b).

## **2.2. Adjuvante: QA-21**

O principal requisito de uma vacina contra a LCan é a produção de uma forte resposta imunitária mediada por células Th1. A administração de antígenos inativados não costuma produzir este resultado de forma eficaz e, por outro lado, muitos adjuvantes convencionais apenas são eficazes na estimulação de uma resposta humoral (Virbac, 2011).

Após se terem em consideração várias opções selecionou-se o adjuvante QA-21 que é uma fração altamente purificada da saponina Quil-A, proveniente da casca da árvore *Quillaja saponaria*. O QA-21 para além de possuir a capacidade rara de estimular a resposta Th1 e a produção de linfócitos T citotóxicos, apresenta um excelente perfil geral de segurança (Kensil, 1996; Sun, Xie & Ye, 2009; Virbac, 2011).

A título de curiosidade, o QA-21 é o análogo para utilização em humanos na vacina candidata mais avançada contra a malária que se encontra atualmente na fase III dos ensaios clínicos (Ballou, 2009). O Quil-A foi considerado demasiado tóxico para ser usado em vacinas para humanos, tendo originado em muitos casos reações locais graves como granulomas e hemólise (Kensil, 1996; Sun *et al.*, 2009).

Durante a extensa fase de desenvolvimento de CaniLeish® foram testadas muitas formulações da vacina utilizando diferentes quantidades de PSE e de QA-21. Assim, para atingir uma proteção máxima com a maior margem de segurança, determinou-se que a formulação final deveria conter pelo menos 100µg de PSE em combinação com 60µg de QA-21 (Virbac, 2011).

## **2.3. Excipiente liofilizado: TMS**

Durante a conservação de vacinas à base de proteínas os antígenos podem sofrer diversas reações de degradação que podem chegar a alterar a eficácia da própria vacina. Para prevenir que isto aconteça pode utilizar-se uma forma liofilizada que requer o uso de um excipiente de liofilização apropriado. O excipiente na CaniLeish® contém o tampão trometamol para a manutenção de um pH correto, sucrose para prevenir o dano das proteínas durante o processo de congelação e o agente de volume manitol para o resíduo seco liofilizado (Virbac, 2011).

## **3. IMUNOLOGIA E MODO DE AÇÃO**

Como já foi referido, a eliminação do parasita e a resistência à LCan está associada a uma forte imunidade celular do tipo Th1, com um predomínio de citocinas Th1 numa resposta

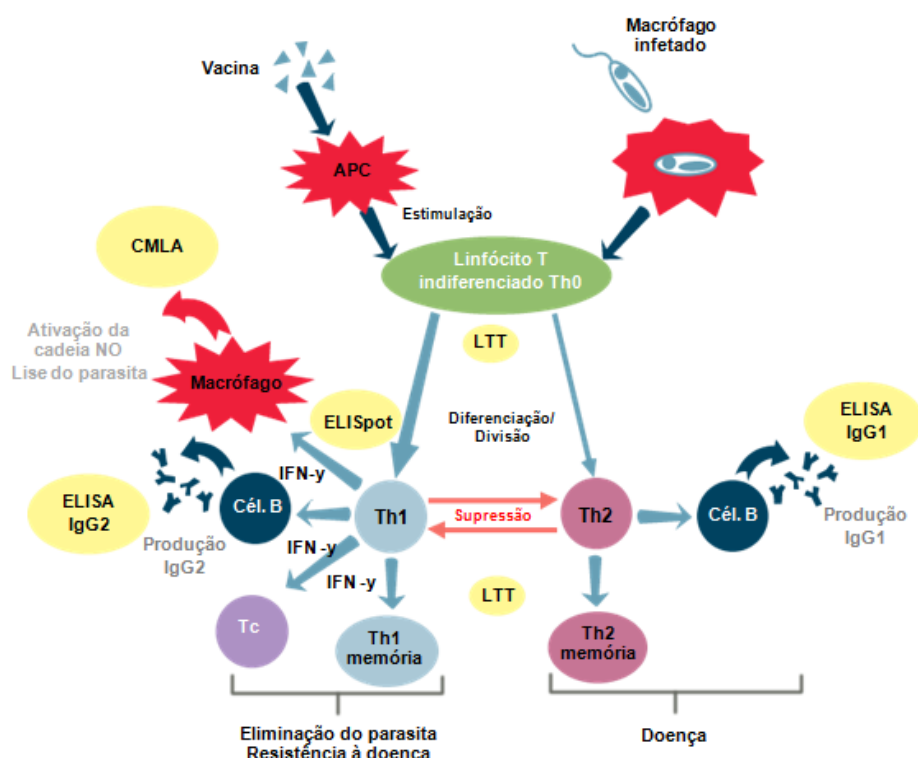
global conjunta Th1/Th2 (Pinelli *et al.*, 1994; Santos-Gomes *et al.*, 2002). A progressão para a doença resulta de uma predominância de citocinas Th2 e de uma acentuada resposta humoral na ausência de uma forte resposta Th1 (Carrillo & Moreno, 2009). Ambas as respostas ativam também a produção de células memória as quais podem desencadear as respectivas ações do tipo Th1 ou Th2 se o antígeno for novamente apresentado. A escolha de um perfil de expressão citocina Th1 ou Th2 tem um profundo impacto na forma como o macrófago lida com o parasita, em parte como resultado dos efeitos no metabolismo da L-arginina, um nutriente-chave utilizado tanto pelos macrófagos como pelas *Leishmanias* (Barbiéri, 2006; Kumar *et al.*, 2010). A estimulação pelas citocinas Th1, especialmente o IFN- $\gamma$ , regula a óxido nítrico sintetase (iNOS), resultando no metabolismo da L-arginina em NO, que é leishmanicida e que provoca também inibição da arginase (Mori & Gotoh, 2004). A estimulação da citocina Th2 favorece a atividade da arginase e produz poliamidas, uma fonte nutricional que permite a replicação e a permanência do parasita (Noël, Raes, Hassanzadeh Ghassabeh, De Baetselier & Beschin, 2004; Kreider, Anthony, Urban & Gause, 2007). Portanto, as citocinas Th1 tais como o IFN- $\gamma$  desempenham um papel fundamental na orientação da via correta da resposta imune.

O principal requisito imunológico exigido a uma vacina eficaz contra a LCan é que seja capaz de orientar a resposta imune para desenvolver uma capacidade de memória eficaz com predomínio Th1 (Virbac, 2011).

Durante o desenvolvimento de CaniLeish® utilizaram-se vários testes (assinalados a amarelo na Figura 3) para avaliar o modo como modula a resposta imunitária, sendo interessante a correlação dos resultados obtidos com os mecanismos de imunidade anti-parasitária.



**Figura 3** - Mecanismos da resposta imunitária e testes de avaliação aplicados (adaptado de Virbac, 2011).



Legenda: Testes utilizados para demonstrar que a vacina direciona a resposta imunitária correta, resultando na produção apropriada de células de memória Th1 capazes de estimular a atividade leishmanicida dos macrófagos. APC, Células Apresentadoras de Antígeno; IFN-γ, Interferon gama; Tc, Linfócito T citotóxico; Th, Linfócito T *Helper*; NO, Óxido Nítrico; LTT, Teste de Transformação Linfoblástica; CMLA, Análise Leishmanicida dos Macrófagos Caninos; *ELISpot*, *Enzyme Linked ImmunoSpot*

A capacidade da vacina, para induzir células de memória que proliferam de forma específica em resposta à exposição a *Leishmania infantum*, foi confirmada através do Teste de Transformação Linfoblástica (LTT). Efetuou-se também a prova *ELISpot* (*Enzyme Linked ImmunoSpot*), que mede a proporção de células em multiplicação que está a produzir IFN-γ, e confirmou a polaridade Th1 destas células de memória. Combinando ambas as provas pode ser demonstrado que os cães, quando se vacinaram a nível experimental com CaniLeish®, foram capazes de produzir as células de memória Th1 esperadas contra o parasita. Desenvolveu-se outro teste, o CMLA (Análise Leishmanicida dos Macrófagos Caninos), que confirmou que a vacina não só induzia a polaridade Th1 nas células de memória como também que estas podiam estimular a atividade leishmanicida dos macrófagos tendo-se observado o aparecimento rápido da capacidade de eliminação do parasita nas três semanas posteriores à primo-vacinação e que se mantém durante um ano no mínimo. Outras provas também confirmaram que o importante efeito leishmanicida estava correlacionado com a indução da NOS e com a consequente produção de NO. Os testes ELISA IgG1/IgG2 atuam como marcadores simples da imunogenicidade do antígeno.

Tudo isto está de acordo com o mecanismo de ação conhecido da resposta imune celular do tipo Th1 desejada (Virbac, 2011; Moreno *et al.*, 2012).

#### **4. ESTUDOS DE EFICÁCIA**

O objetivo principal da vacinação contra qualquer doença induzida por protozoários é o de minimizar o número de cães vacinados que progridem para um estadio sintomático da doença em que a vida do animal está em risco e o tratamento é necessário (Virbac, 2011). No entanto, e devido à natureza extremamente variável da LCan, também é de grande valor minimizar o número de cães com infeção assintomática já que estes, apesar de aparentemente saudáveis, são infecciosos para o vetor e, conseqüentemente, contribuem de forma considerável para a epidemiologia da doença, correndo também o risco de progredir para o estado sintomático (Michalsky *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Para alcançar estes objetivos o principal requisito de uma vacina contra a LCan é o de induzir uma imunidade sólida, específica e mediada por células, como requerido para um patógeno intracelular (Gradoni, 2001). Uma resposta como esta será capaz de reconhecer o antígeno e desenvolver uma memória imunológica de longa duração com uma forte polaridade Th1 que, por sua vez, desencadeará uma resposta ativa eficaz com predomínio Th1 nos contactos futuros com o parasita (Virbac, 2011).

Para responder à necessidade de demonstração de proteção clínica, os benefícios da CaniLeish® foram evidenciados de dois modos: inicialmente, num ensaio experimental desenhado para demonstrar a duração da imunidade e posteriormente num ensaio de campo onde os cães foram expostos a pressões elevadas e contínuas de infeção natural durante duas épocas de transmissão (Virbac, 2011).

##### **4.1. Ensaio experimental**

A eficácia de CaniLeish® foi demonstrada em primeiro lugar num desafio experimental em que se utilizaram 20 cães de 6 meses de idade, em que 10 se submeteram ao programa normal de vacinação (primo-vacinação de três injeções a intervalos de três semanas, seguidas de reforços anuais) e os outros 10 não foram vacinados servindo de grupo controlo. Um ano após o programa de vacinação inicial, momento em que se deveria aplicar um reforço, todos os cães foram submetidos a um desafio mediante injeção intravenosa de  $10^{8.5}$  promastigotas de *L. infantum* altamente virulentos. Estes promastigotas foram preparados a partir de amastigotas obtidos do baço de cães infetados, para assegurar a sua infecciosidade. Este número tão elevado de parasitas virulentos inoculados e a via de administração intravenosa eleita para favorecer uma rápida disseminação pelo organismo representaram condições extremas de desafio artificial desenhadas para produzir uma infeção ativa no máximo número de cães (Virbac, 2011).

Realizaram-se análises sanguíneas de rotina para avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos e IFI e extraíram-se amostras de medula óssea para detetar o parasita mediante cultura e PCR quantitativo. No grupo controlo: sete cães tiveram uma infeção ativa assintomática, um cão foi positivo apenas ao PCR e dois cães mantiveram-se negativos a *Leishmania*. No grupo dos cães vacinados três cães tiveram uma infeção ativa assintomática, enquanto sete cães mantiveram-se sem *Leishmania* (Virbac, 2011).

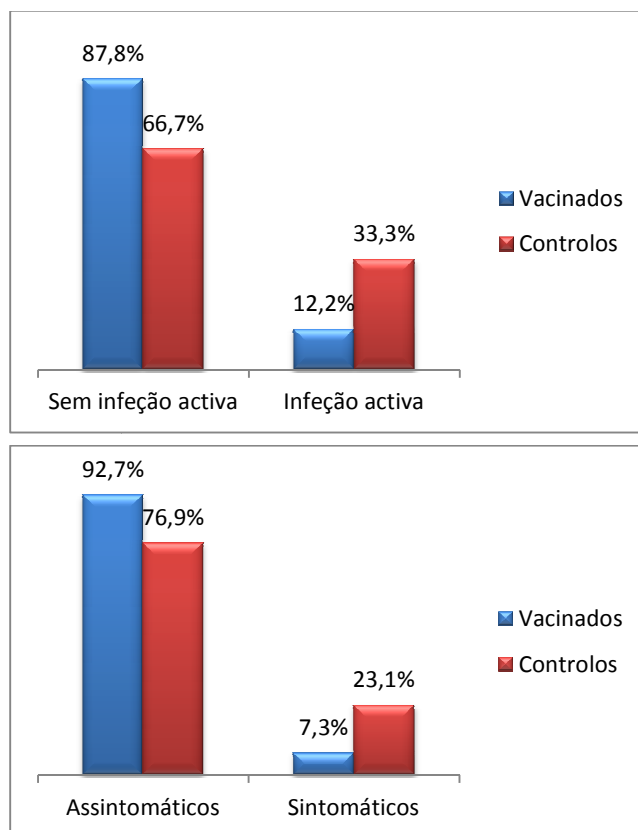
Neste estudo, em que se administrou um desafio intravenoso massivo com promastigotas virulentos de *L. infantum*, um ano após se ter completado a primo-vacinação, as diferentes respostas ao desafio nos dois grupos demonstram um claro benefício da vacinação com CaniLeish®. Este benefício é evidente, inclusive apesar do desafio ter tido lugar um ano após as vacinações e sem a administração do reforço, o que confirma que a imunidade tem uma duração mínima de um ano (Virbac, 2011).

#### **4.2. Ensaio de campo**

Apesar do interesse dos modelos, e como o anteriormente descrito, a melhor prova para demonstrar a eficácia de uma vacina para uma doença como a Leishmaniose é, evidentemente, reproduzir as condições de campo tanto quanto seja possível. Na vida real os cães não estão expostos a um desafio de dose única elevada mas sim a múltiplas picadas infetantes ao longo de um período prolongado durante as temporadas de transmissão (Gradoni *et al.*, 2005).

Para este estudo de eficácia da CaniLeish® os cães foram submetidos a uma exposição natural múltipla ao parasita em zonas de elevada pressão de infeção (EMA, 2011a). O estudo realizou-se em duas partes. Na primeira parte participaram 80 *Beagles* de aproximadamente 6 meses de idade que se mantiveram em condições laboratoriais controladas e foram colocados aleatoriamente em dois grupos: vacinados e controlos. Depois os cães transferiram-se para canis a céu aberto situados em duas zonas altamente endémicas para *L. infantum*, uma em Espanha (próximo de Barcelona) e a outra em Itália (perto de Nápoles) para assegurar que os cães estariam expostos a uma pressão parasitária extremamente elevada ao longo do período de estudo. Os animais foram expostos a este meio de infeção natural durante duas estações de transmissão consecutivas e não se lhes aplicou nenhum repelente nem nenhum tratamento contra a doença. Os cães foram avaliados a cada três meses mediante exames clínicos, bem como com culturas de amostras da medula óssea ou linfonodos e PCR quantitativa para detetar os parasitas (Virbac, 2011; EMA, 2011b).

**Gráficos 1 e 2** - Resultados do estudo de campo (Fonte: Virbac, 2011).



Os resultados apresentados nos Gráficos 1 e 2 confirmam a eficácia da vacina, inclusive ante a possibilidade de níveis exceccionalmente elevados de desafio natural, sem proteção adicional contra o vetor. Nestas condições extremas, em que 23,1% dos cães do grupo controlo desenvolveram sinais clínicos ao fim de dois anos e que raramente ou nunca acontecem na realidade, 92,7% dos cães do grupo CaniLeish® não desenvolveram Leishmaniose clínica (Virbac, 2011). Aliás a prevalência normal da doença clínica costuma ser inferior a 10% em áreas endémicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Nestes estudos, a vacinação com CaniLeish®, forneceu, de uma forma consistente, benefícios estatisticamente significativos aos cães vacinados, demonstrando ser capaz de reduzir quatro vezes o risco de um cão se tornar ativamente infetado e de progressão para estadios sintomáticos de Leishmaniose (Virbac, 2011; EMA, 2011a). Pela demonstração conclusiva de eficácia da vacina nestas condições extremas, estes dados confirmam a utilidade das propriedades de estimulação imunitária da CaniLeish® em cães que possam estar expostos ao parasita. Os resultados são completamente coerentes com a forma como a vacina funciona, porque a mesma não impede que o parasita entre no corpo, mas estimula e direciona a resposta imune para que o cão seja capaz de lidar com a invasão parasitária, tendo assim reduzido o risco de desenvolver uma doença mortal e difícil de tratar. Na verdade, a CaniLeish® é a única medida preventiva direccionada para o próprio parasita (Virbac, 2011).

### **4.3. Conclusões gerais**

Os resultados, tanto do estudo de estação como do estudo de desafio intravenoso experimental, demonstraram de maneira concludente a significativa e valiosa redução do risco de infecção ativa, e de Leishmaniose clínica, obtidas com a utilização da vacina CaniLeish®. Estes resultados são também apoiados pelos dados provenientes de vários parâmetros imunológicos medidos em vários estudos que demonstraram o desenvolvimento de uma resposta imunitária de memória benéfica de tipo Th1. Portanto, a CaniLeish® cumpre com o objetivo clínico de minimizar o número de cães que progridem para um estado de doença sintomática e com o requisito principal para uma vacina contra a LCan ao estimular uma resposta imune de memória específica e duradoura com uma forte polaridade Th1 (Virbac, 2011).

## **5. ESTUDOS DE SEGURANÇA**

O perfil de segurança de qualquer vacina é um fator muito importante a ter em conta. As vacinas utilizam-se normalmente para prevenir doenças e, por tanto, são administradas a animais saudáveis. Os proprietários são, em geral, menos tolerantes aos efeitos adversos que ocorrem em animais sãos tratados profilaticamente do que aos que acontecem em animais doentes submetidos a tratamentos com fármacos (Cornez, 2009).

Durante o desenvolvimento de CaniLeish®, para garantir um elevado nível de proteção associado a um bom perfil de segurança, foram realizados dois tipos de estudos: testes de laboratório e ensaios de campo (Virbac, 2011).

### **5.1. Testes de laboratório: segurança de uma dose extra e sobredosagem**

Os testes de laboratório realizaram-se em cenários experimentais altamente controlados, em que se puderam obter dados muito precisos acerca do tamanho e natureza da inflamação local e das respostas hipertérmicas. Foram também desenhados para simular situações mais severas que as experimentadas pelos animais em condições normais de campo, utilizando-se para isso cães com idade inferior à idade recomendada (6 meses), doses mais elevadas de antígenos e não se efetuando massagem nos locais de injeção (Virbac, 2011).

Assim realizaram-se dois estudos, sendo que no primeiro avaliou-se a segurança da vacina com quatro doses administradas com 3 semanas de intervalo (dose extra) e no segundo avaliou-se a segurança de uma sobredose mediante a aplicação de uma dose dupla. Para ambos os estudos utilizou-se um protocolo similar no qual foram formuladas doses para conter 10% a mais de antígeno que as doses comerciais e vacinaram-se 10 cães mantendo-se um grupo de 5 cães como grupo controlo. Todos os cães pertenciam à raça *Beagle* e tinham quatro meses de idade e a zona de injeção foi rapada e sem massagem

para permitir uma avaliação fácil e precisa das reações que pudessem ocorrer na área local (Virbac, 2011; EMA, 2011b).

No primeiro estudo, todos os cachorros apresentaram uma tumefação local, pelo menos numa das administrações. O tamanho máximo destas tumefações foi de dez centímetros, mas a maioria foi detetável unicamente mediante palpação, apesar de a zona ter sido rapada. Todas se resolveram espontaneamente num máximo de 12 dias. Apenas um cachorro mostrou uma hipertermia ligeira, mas só após a primeira injeção. Em geral, a administração de quatro doses da vacina foi bem tolerada. O único sinal significativo foi a tumefação local, ligeira e transitória (Virbac, 2011; EMA, 2011b).

No segundo estudo, em que se administrou uma dose dupla, houve uma incidência ligeiramente superior de hipertermia ligeira (três dos dez cachorros durante apenas um dia). Sete dos dez cães mostraram uma tumefação local com um tamanho máximo de sete centímetros e com uma duração máxima de cinco dias. Portanto, a administração de uma dose dupla foi bem tolerada, sendo as únicas reacções adversas a tumefação local, ligeira e transitória acompanhada de hipertermia passageira ocasional (Virbac, 2011; EMA, 2011b).

## **5.2. Ensaio de campo: segurança em várias raças e percepção dos proprietários**

Os ensaios de campo foram executados para se alcançar uma percepção mais 'real' da importância das reações no animal e para o proprietário, implicando um número muito superior de cães e diversas raças. Assim, realizaram-se dois estudos em que participaram animais de raças e idades diferentes, com proprietário, aos que se administrou a primovacinação normal com as mesmas especificações que a vacina comercial. Nestes estudos massajou-se mas não se rapou o local de injeção (Virbac, 2011).

No primeiro estudo participaram 151 cães (61 eram cachorros de 4 ou 5 meses e 90 tinham 6 ou mais meses de idade) provenientes de regiões endémicas ou não endémicas de França. Todas as raças podiam ser incluídas no estudo sendo as mais comuns o Bretão Espanhol (7,9% dos cães), o Labrador *Retriever* (7,3% dos cães) e o *Rottweiler* (4,6% dos cães). Aproximadamente 25% dos animais com idade igual ou superior a 6 meses apresentaram reacções locais na área de injeção. A duração máxima foi de 15 dias após a primeira injeção e de uma semana após a segunda e terceira injeções. Neste grupo de idade, a incidência de pelo menos um sintoma geral como letargia, hipertermia, alterações digestivas, entre outros, situa-se entre o 15 e o 20% após cada injeção. A incidência de reacções locais e sintomas gerais foi, como era de esperar, superior nos cachorros de menor idade. Estes resultados demonstram que a vacina é bem tolerada em condições de campo (Virbac, 2011; EMA, 2011b; McGahie, 2011b).

No segundo estudo de campo obteve-se a percepção dos proprietários, que estavam conscientes de que se tratava de uma vacina em fase de desenvolvimento e que, por tanto, devia ser submetida a estudos de segurança. Utilizaram-se 231 cães entre os 6 meses e os

12 anos de idade provenientes de áreas endêmicas de Itália e França. Pediu-se aos proprietários que observassem os seus animais diariamente e que registassem especificamente se havia inflamação ou dor no ponto de injeção. Neste estudo, 8 cães (3,5%) tiveram reações locais descritas pelos seus proprietários, e num único animal estas reações repetiram-se após cada uma das injeções, contudo foram diminuindo de duração e intensidade. O sinal geral detetado com maior frequência foi a letargia, descrita em 5 cães (2,2%) com uma duração de um dia em 4 cães e de três dias no outro. Ainda que a taxa de reações relatadas pelos proprietários, nas condições de campo, tenha sido ligeiramente superior à normalmente expectável para uma vacina vírica ou bacteriana comum, continua a ser baixa para uma vacina anti-*Leishmania* eficaz. Pode assim dizer-se que a CaniLeish® é uma vacina muito bem tolerada pela maioria dos animais (Virbac, 2011; McGahie, 2011b).

### **5.3. Conclusões gerais**

O método de produção único das PSE de CaniLeish® desempenha um papel importante na segurança desta inovadora vacina pois garante que esta contenha apenas proteínas derivadas do parasita com ausência do parasita completo e portanto sem risco de retorno da virulência no hospedeiro (Virbac, 2011; EMA, 2011b).

Os estudos efetuados demonstraram a ocorrência de reações adversas moderadas e passageiras, tais como tumefação, nódulo, dor à palpação ou eritema, no local de administração, observadas após a vacinação mas que desaparecem espontaneamente em 2 a 15 dias. Outros sinais passageiros comuns como hipertermia, apatia e alterações digestivas podem também ocorrer (EMA, 2011a). Estas reações estão reportadas no RCM e são consideradas como reações pós-vacinais aceitáveis para uma vacina canina (EMA, 2011b). É interessante notar, que as reações locais tenderam a ter um tamanho e intensidade inferiores nas vacinações posteriores (Virbac, 2011). Apenas se considera necessário não continuar com o resto da primo-vacinação em casos excecionais e após avaliação do benefício-risco de cada indivíduo (Virbac, 2011). As reações do tipo alérgico não são comuns e, caso surjam, deve ser administrado o tratamento sintomático adequado (EMA, 2011a). Em geral, esta vacina é bem tolerada e os dados confirmam que CaniLeish® tem um bom perfil de segurança para uma vacina anti-*Leishmania* eficaz (Virbac, 2011). Apesar da vacina não se encontrar autorizada para uso em cães positivos para a *Leishmania*, parece que a segurança da CaniLeish® nesses cães é tão boa como na restante população (EMA, 2011b).

## **6. UTILIZAÇÃO DA CANILEISH® NA PRÁTICA CLÍNICA DIÁRIA**

### **6.1. Esquema de vacinação**

Canileish® está indicada para utilização em cães *Leishmania* negativos a partir dos 6 meses de idade, de modo a reduzir o risco de uma infeção ativa e de doença clínica após contacto com o parasita *Leishmania infantum* (EMA, 2011a).

O protocolo de primo-vacinação consiste na administração, por via subcutânea, de 3 doses com 3 semanas de intervalo. Os estudos realizados durante o desenvolvimento de Canileish® confirmaram que este é o esquema de administração ótimo para assegurar que se produz a mudança necessária para uma imunidade celular com predomínio Th1 no número máximo de cães (Virbac, 2011). A idade mínima estipulada para a vacinação baseia-se principalmente no facto de ter sido a partir desta idade que os testes de eficácia foram realizados e, por a maturidade da imunidade celular nos cães jovens ser mais lenta que a da resposta humoral (Day, 2007; Virbac, 2011). O início da imunidade ocorre 4 semanas após a última injeção da primo-vacinação e, posteriormente é necessária uma revacinação anual de forma a manter os níveis de resistência imunitária do animal (EMA, 2011a).

Atualmente não existem dados sobre a administração simultânea de Canileish® com outras vacinas. Contudo, após a administração de uma vacina pode ocorrer um período de diminuição da capacidade de resposta imunológica à introdução de outros antígenos, de aproximadamente uma semana. Assim, para garantir uma margem de segurança, deve ser respeitado um prazo mínimo de duas semanas de intervalo entre a vacinação com Canileish® e todas as outras vacinas (Virbac, 2011).

A decisão da administração da vacina, em zonas de baixa ou nula prevalência de infeção, deverá depender da avaliação da relação benefício-risco por parte do médico veterinário responsável (EMA, 2011c).

### **6.2. Requisitos necessários para a utilização correta da vacina**

Uma vez que a eficácia da vacina apenas foi estabelecida em cães negativos a *Leishmania*, desconhece-se a eficácia da mesma para retardar ou prevenir a progressão da doença em cães já infetados. Portanto, recomenda-se efetuar o despiste da infeção a todos os cães antes da primeira vacinação. Para o efeito, existem diversas opções disponíveis em termos de testes de diagnóstico, tais como: serologia (IFI, ELISA e testes rápidos), citologia e imunohistoquímica, cultura e PCR (Virbac, 2011).

#### **6.2.1. Testes serológicos**

Tendo em conta a diversidade de meios de diagnóstico disponíveis, a serologia apresenta-se como a melhor opção devido à rapidez de resultados e baixo custo, sendo também um método com uma relação sensibilidade-especificidade bastante aceitável. Assim, a serologia



é o método de despiste pré-vacinação mais prático e adequado, existindo várias opções disponíveis: IFI, ELISA e testes rápidos (Virbac, 2011).

#### 6.2.1.1 IFI e ELISA

Como referido anteriormente, a IFI é o *'gold standard'* (prova de ouro) em termos de diagnóstico da doença, podendo também ser utilizada no rastreio pré-vacinal. O ELISA quantitativo também pode ser aplicado, apesar de a sua utilização ser menos comum. Normalmente, os resultados dos testes IFI e ELISA não estão disponíveis no mesmo dia, sendo necessária uma segunda visita à clínica para proceder à vacinação (Virbac, 2011).

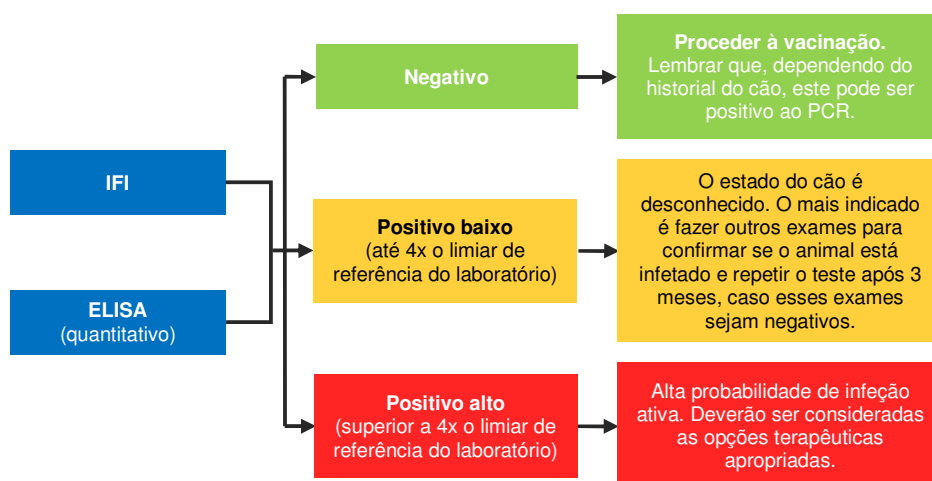
Se o resultado da IFI for negativo, pode iniciar-se a vacinação. No entanto, ainda existe a possibilidade de o cão ser portador do parasita, uma vez que são necessários alguns meses desde a infeção até à existência de títulos elevados de anticorpos. Este risco não pode ser completamente eliminado.

Caso a IFI apresente um resultado "positivo baixo" (entre o limiar de referência do laboratório e 4x o limiar de referência), este resultado pode ser associado, quer a uma doença iminente, quer a um cão resistente que tem lutado contra a infeção. Nesta fase, estes cães não devem ser vacinados (Virbac, 2011). As atuais linhas-diretrizes recomendam o acompanhamento destes cães e a repetição do teste cerca de 3 meses mais tarde (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Se o teste seguinte for negativo pode então dar-se início à vacinação, mas se o teste permanecer positivo a vacinação não é recomendada, pois nesta situação a eficácia da CaniLeish® é desconhecida (Virbac, 2011).

Caso a IFI apresente um resultado "positivo alto" (4x acima do limiar de referência do laboratório), não é aconselhada a vacinação (Virbac, 2011). As atuais linhas-diretrizes recomendam que o cão seja considerado como um animal doente e seja instituído o tratamento adequado (Figura 4) (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Após a vacinação existe ainda a possibilidade de surgirem anticorpos anti-*Leishmania* transitórios detetáveis pela IFI, levando assim a um resultado falso positivo (EMA, 2011a).

**Figura 4** - Representação esquemática do modo de ação a desenvolver face aos resultados obtidos mediante IFI ou ELISA (adaptado de Virbac, 2011).



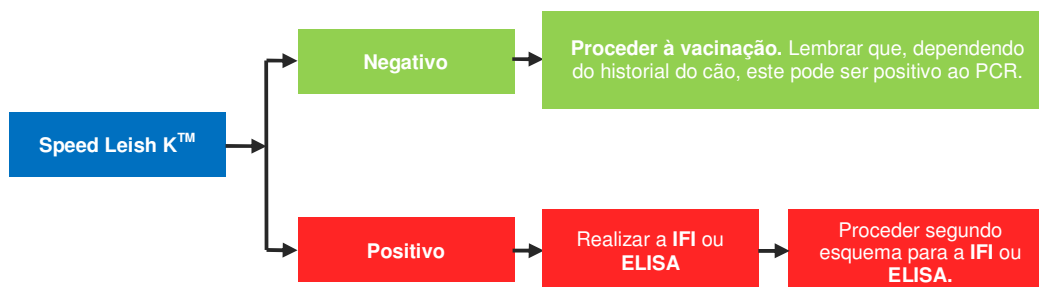
### 6.2.1.2. Testes rápidos

De acordo com a EMA (2011a), é recomendada a utilização de um teste serológico de diagnóstico rápido para despiste da Leishmaniose previamente à vacinação com CaniLeish®. A serologia rápida tem a vantagem de fornecer resultados imediatos, permitindo a vacinação do cão no mesmo dia (Virbac, 2011). A Virbac disponibilizou um novo teste rápido baseado na tecnologia das cinesinas, o Speed Leish K™, o qual apresenta 98,5% de concordância com a IFI, o que é fulcral pois permite que a confiança nos resultados se mantenha (Chene, 2010). Um resultado positivo com Speed Leish K™ é equivalente a um título de IFI aproximadamente de 1/100 ou superior, significando que o teste é muito sensível, mas mantendo uma boa especificidade. Não existe o risco de falsos positivos resultantes da infecção por outros agentes patogénicos como a *Babesia*, *Ehrlichia*, ou *Anaplasma*. Além disso, o Speed Leish K™ deteta especificamente a existência de anticorpos contra as cinesinas da *Leishmania* e como estas não estão incluídas nas Proteínas Secretadas-Excretadas (PSE) presentes na CaniLeish®, o teste não deteta os anticorpos induzidos pela vacinação, não existindo assim o risco de ocorrer um resultado falso positivo. Os anticorpos vacinais não interferem nem com o Speed Leish K™, nem com outros testes de diagnóstico como a visualização de esfregaços, imunohistoquímica, cultura e PCR (Virbac, 2011).

Pelo facto do Speed Leish K™ não ser um teste quantitativo, um resultado positivo pode corresponder a dois cenários IFI diferentes: o título pode ser um "positivo baixo" ou um "positivo alto" (Figura 5). A única forma de diferenciar entre estas duas possibilidades é a realização de um teste quantitativo (Virbac, 2011).

O Speed Leish K™ é ideal para o despiste pré-vacinação e um resultado negativo permite iniciar a vacinação no mesmo dia em que o teste é realizado (Virbac, 2011).

**Figura 5** - Representação esquemática do modo de ação a desenvolver face a um resultado positivo ou negativo utilizando um teste rápido Speed Leish K™ (adaptado de Virbac, 2011).



### 6.3. Precauções adicionais

A desparasitação antes da vacinação é recomendada pois a presença de uma forte carga parasitária pode favorecer uma resposta imune com predomínio Th2 inadequada (Kamal &

El, 2006; EMA, 2011a). Outros parasitas podem também causar impacto como, por exemplo, *Ehrlichia* que contribui, de forma muito provável, para o estabelecimento da LCan (Mekuzas, Gradoni, Oliva, Foglia Manzillo & Baneth, 2009).

A prática da vacinação com CaniLeish® não deve invalidar a aplicação de medidas destinadas a reduzir a exposição aos flebótomos (EMA, 2011a). Assim, a proteção imunológica totalmente inovadora conferida pela CaniLeish® contra a LCan, pode ser associada a todas as outras medidas destinadas a reduzir a exposição aos flebótomos, o que pode ser particularmente importante dependendo do nível de exposição a que o cão se encontra sujeito. Portanto, um adequado controlo parasitário quer dos parasitas internos, quer dos parasitas externos, contribui, não só para o estado de saúde geral do cão, como também ajuda a atenuar fatores secundários passíveis de contrariar os efeitos benéficos da CaniLeish® sobre o sistema imunitário (Virbac, 2011).

## **7. CANILEISH® E A PROTEÇÃO DA SAÚDE PÚBLICA**

Uma vacina que permita reduzir a infeção ativa e consequentemente o número de cães que atuam como reservatório seria um instrumento útil para reduzir a incidência da Leishmaniose humana (EMA, 2011b). Assim, um possível impacto da CaniLeish® na saúde pública não pode ser excluído. Contudo, e como relatado no RCM do produto, “A informação disponível não permite avaliar o impacto da vacina na saúde pública ou no controlo da infeção em humanos”, nenhuma conclusão pode ser enunciada necessitando-se de investigações futuras (EMA, 2011a).

## **CAPÍTULO IV – A FARMACOECONOMIA APLICADA À MEDICINA VETERINÁRIA: ANÁLISE DE CUSTO ENTRE O TRATAMENTO E A VACINAÇÃO DA LEISHMANIOSE CANINA**

### **1. INTRODUÇÃO**

A LCan causada por *Leishmania infantum* é uma doença crónica e potencialmente fatal com uma ampla distribuição geográfica. Esta zoonose, presente ao longo da bacia Mediterrânica e em regiões de África, Ásia e América Central e do Sul, e que começa a alastrar para áreas não endémicas, constitui um grave problema de saúde pública e veterinária (Baneth *et al.*, 2008).

Em Portugal a doença tem-se difundido e registado um crescimento expressivo nas últimas duas décadas, com uma seroprevalência de mais de 20% encontrada em algumas localidades (Cortes, Afonso, Alves-Pires & Campino, 2007).

Pela primeira vez está disponível na Europa uma vacina com uma ação específica contra a Leishmaniose. A CaniLeish® está indicada para utilização em cães *Leishmania* negativos a partir dos 6 meses de idade, de modo a reduzir o risco de uma infeção ativa e de doença clínica após contacto com o parasita (Virbac, 2011).

O objetivo deste estudo foi o de analisar os custos decorrentes do tratamento de animais com doença clínica e da vacinação como medida preventiva para a infeção por *Leishmania*, sendo um exemplo de avaliação farmacoeconómica aplicado às ciências veterinárias.

### **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Para aplicação dos conceitos farmacoeconómicos realizou-se, numa folha de cálculo universal (Microsoft Excel), uma avaliação parcial, mais propriamente uma análise de custo em que se fez uma análise de custos comparada entre a prevenção da LCan através da vacina CaniLeish® e o tratamento de um animal com Leishmaniose clínica.

Os custos decorrentes da LCan podem ser divididos em: custos diretos, indiretos e intangíveis. Os custos diretos são representados por custos de tratamento, custos de diagnóstico, serviços veterinários (consultas), e os custos indiretos, que são muito variáveis, são, por exemplo, custos de perdas de produção (cães de caça, cães-guia, cães pastores), eutanásias, casos fatais e perda de oportunidades de prémio, por exemplo, no caso de animais de competição. Já os custos intangíveis, como o sofrimento do animal ou redução da qualidade de vida, como também o sofrimento do proprietário, são bastante complexos e de difícil quantificação. Neste estudo somente os custos diretos decorrentes da LCan irão ser abordados.

Os cálculos foram realizados tendo como base um canídeo, com 2 anos de idade e com pesos vivos de 10 kg, 20 kg e 30 kg, pesos representativos das raças pequena, média e grande, respetivamente. De referir que, como a prevalência da doença é mais elevada em

cães com menos de três anos e mais de oito, a idade de 2 anos foi a escolhida (Palatnik-de-Sousa, 2012).

Os preços dos medicamentos, e outros produtos, considerados nesta análise foram os preços de venda ao público (PVP) gentilmente cedidos pelo Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL).

Os protocolos de **tratamento** adotados seguiram as linhas-diretrizes elaboradas pelo grupo LeishVet (Tabela 6). Assim, para o efeito contabilizaram-se os custos do antimoniato de meglumina (100 mg/kg SID durante 30 dias SC) ou da miltefosina (2mg/kg SID durante 28 dias PO) ambos combinados com o alopurinol (10 mg/kg BID durante 6 meses PO).

**Tabela 6** - Protocolos atuais no tratamento da LCan (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Fármacos	Doses
Antimoniato de Meglumina	75-100mg/kg SID ou 40-75mg/kg BID durante 4 semanas SC (pode ser prolongado 2-3 semanas se animal não melhorar)
Miltefosina	2mg/kg SID durante 28 dias PO
Alopurinol	10mg/kg BID no mínimo durante 6-12 meses PO

Legenda: SID, uma vez por dia; BID, duas vezes por dia; SC, via subcutânea; PO, *per os*.

Os custos de tratamento incluíram também os métodos de diagnóstico (análises bioquímicas - hemograma, ALT, FAS, ureia/creatinina, urianálise, proteínograma; o teste rápido Speed Leish K™ e método serológico de referência IFI), seguimento clínico (análises bioquímicas e IFI) e recaídas.

Regra geral as recaídas ocorrem entre os 6 meses e os 2 anos após o final da terapêutica instituída. Assim, foi assumido que o animal apresenta recidivas de ano e meio a ano e meio, pelo que se consideram 3 recidivas, e que morre ao final dos sete anos de idade (Campillo *et al.*, 1999).

O protocolo de **primo-vacinação** com CaniLeish® consiste na administração por via subcutânea de 3 doses com 3 semanas de intervalo, sendo posteriormente realizada a revacinação anual. O rastreio pré-vacinal com o teste rápido Speed Leish K™ também foi incluído nos custos. Estipulou-se que o cão foi vacinado até aos 10 anos, pelo que se considerou a primo-vacinação e 8 revacinações.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do estudo farmacoeconómico realizado encontram-se representados nas Tabelas 7A, 7B e 7C. Os cálculos realizados são apresentados com mais pormenor no Anexo 2.

**Tabela 7A - Custos de Vacinação**

Peso animal (kg)	VACINAÇÃO CANILEISH®		
	Custos 1ºAno (€)	Custos Revacinação (€)	Custos Totais (€)
10	148	360	508
20			
30			

**Tabela 7B - Custos de Tratamento**

Peso animal (kg)	TRATAMENTO AM + A		TRATAMENTO M + A	
	Custos 1ºAno (€)	Custos Totais (€)	Custos 1ºAno (€)	Custos Totais (€)
10	234	1441	247	1493
20	317	1772	333	1836
30	407	2133	405	2127

Legenda: AM, Antimoniato de Meglumina; M, Miltefosina; A, Alopurinol.

**Tabela 7C - Rácio Custos Tratamento *versus* Custos Vacinação**

Peso animal (kg)	Item	1ºAno	Total
10	Custos Tratamento AM + A/ Custos Vacinação	1,58	2,84
	Custos Tratamento M + A/ Custos Vacinação	1,67	2,94
20	Custos Tratamento AM + A/ Custos Vacinação	2,14	3,49
	Custos Tratamento M + A/ Custos Vacinação	2,25	3,61
30	Custos Tratamento AM + A/ Custos Vacinação	2,75	4,20
	Custos Tratamento M + A/ Custos Vacinação	2,74	4,19

Legenda: AM, Antimoniato de Meglumina; M, Miltefosina; A, Alopurinol.

No primeiro ano os custos de prevenção da doença relacionados com a vacina CaniLeish®, são de 148 euros, o que inclui as 3 doses de vacinação e o teste rápido Speed Leish K™. A vacinação entre os 2 e os 10 anos de idade comporta, para o proprietário do animal, encargos monetários totais de cerca de 508 euros que incluem a primo-vacinação e os 8 reforços anuais.

Os custos totais de tratamento relacionados com o antimoniato de meglumina/alopurinol variaram entre os 1441 euros para um animal com 10 kg, e os 2133 euros para um animal com 30kg enquanto que, para o tratamento, com a miltefosina/alopurinol os valores variaram entre os 1493 euros a 2127 euros, valores respetivos para os mesmos pesos.

É relevante frisar que os custos totais de tratamento com o antimoniato de meglumina/alopurinol ou com a miltefosina/alopurinol não incluem os custos de tratamento sintomático, que pode ser necessário instituir e que se refere aos custos com antibióticos, anti-inflamatórios, fluidoterapia e suporte renal ou dietas hipoproteicas especiais. Tal facto

conduz ao aumento significativo dos custos relacionados com o tratamento, dependendo estes do peso do animal, o que não sucede com a vacinação, uma vez que a dose é independente do peso.

No primeiro ano de administração da vacina CaniLeish® são necessárias 3 doses, o que, apesar do preço desta não diferir substancialmente do preço de outras vacinas, tornar-se-á aparentemente mais dispendioso. Convém também, esclarecer que cada Centro de Atendimento Médico-Veterinário (CAMV) possui o seu próprio método de estipulação de preços: o mesmo preço em cada visita (ao administrar-se cada uma das três doses cobra-se o mesmo preço); um preço mais elevado na primeira visita e mais económico nas duas seguintes (um preço mais elevado na primeira visita é justificado pelo facto de se fazer uma análise mais minuciosa, incluindo o teste de despiste); um preço único pelas três visitas (para assegurar que o cliente não vai a outra clínica revacinar o animal, disponibiliza-se a opção de pagar cada visita no momento em que esta se realiza ou uma outra opção como aplicar um desconto se se pagarem as três de uma vez, sendo o caso do Hospital Escolar da FMV) e, ainda, uma estratégia comercial com o teste de despiste da doença (convém definir uma estratégia no momento de cobrar o valor do teste: se o teste for negativo haverá duas opções, ou não é cobrado, ou é incluído no preço da vacina).

Concluiu-se então que, no primeiro ano os custos associados ao tratamento são 1,6 a 2,7 vezes superiores ao da vacinação com Canileish® e que, os custos totais relativos ao tratamento são 2,8 a 4,2 (Tabela 7C) vezes mais dispendiosos que a prevenção com a vacinação.

Assim, o custo médio para tratar um episódio de Leishmaniose é substancialmente superior ao custo relacionado com a prevenção da doença ao longo da vida de um animal, sendo por isso relevante sublinhar que a utilização das ferramentas farmacoeconómicas permite demonstrar que certas opções aparentemente mais onerosas são, na verdade, mais económicas.

Até há pouco tempo, a prevenção da LCan centrava-se nos métodos de controlo do vetor flebótomo. Os parasiticidas e os repelentes parasitários apresentam formulações razoavelmente eficazes, contudo, em condições de campo os maiores problemas advêm dos fatores de adesão/*compliance* do proprietário que não são facilmente controlados: coleiras que se podem perder ou não são substituídas no intervalo de tempo adequado e a incorreta aplicação, ou o não cumprimento, das recomendações na renovação da aplicação de produtos em unção punctiforme (*spot-on*). Consequentemente, para além de existirem períodos de tempo em que o animal não está protegido e, mesmo que se utilizem corretamente, nenhum destes produtos pode prevenir totalmente todas as picadas dos flebótomos (Alvar *et al.*, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2005). A maioria destes produtos demonstrou uma boa eficácia durante períodos de tempo curtos, mas existem algumas

evidências que sugerem que esta eficácia pode ser reduzida com o passar do tempo (Foglia, Oliva, Pagano, Manna, Maroli & Gradoni, 2006).

Como já foi referido, na tentativa de se prevenir a LCan e a Leishmaniose Humana, nalguns países, como o Brasil, experimentou-se uma estratégia de eutanásia obrigatória de cães seropositivos. No entanto, estas estratégias são muito difíceis de aceitar socialmente e de qualquer forma, os cães são infetantes antes de se tornarem seropositivos, por isso esta abordagem não é suficiente para interromper o ciclo de transmissão, sendo possível que os hospedeiros canídeos selvagens também contribuam para a manutenção do ciclo.

O tratamento pode reduzir significativamente a carga parasitária e a prevalência da infeção, mas não faz com que o cão deixe de ser infetante para os flebótomos, pelo que também não pode interromper o ciclo (Solano-Gallego, 2009). A instituição da terapêutica reduz ou elimina os sintomas clínicos, mas não permite alcançar a cura parasitológica. Assim, o risco epidemiológico persiste e os cães que respondem à quimioterapia podem, no entanto, experienciar uma recaída clínica após a cessação do tratamento ou durante o mesmo. Além disso, os medicamentos têm mostrado inúmeras desvantagens, tais como o preço, administrações repetidas, hepato e nefrotoxicidade, que pode tornar a adesão/*compliance* ao tratamento bastante difícil de se conseguir (EMA, 2011b). E, como sabemos, o termo *compliance* descreve o grau de comprometimento/cumprimento de um aconselhamento médico-veterinário, sendo uma garantia adicional para o sucesso terapêutico.

Citando Lenea Campino (2012), “o tratamento deve ser a última coisa a fazer, pois a principal arma que devemos utilizar é a prevenção, para proteger a população canina e também a população humana.”

Até agora, as medidas implementadas mostravam uma capacidade limitada para erradicar, ou mesmo controlar a LCan. A vacinação, complementada pelo controlo dos vetores, era há muito considerada como sendo a solução ideal. Assim, o lançamento da vacina CaniLeish®, veio dar um novo ânimo à classe veterinária, mudando totalmente a perspetiva preventiva e abrindo portas para um novo nível de proteção contra a Leishmaniose. A comercialização da vacina é um passo muito importante já que a LCan é provavelmente a doença infecciosa que mais afeta a saúde da população canina em geral, sendo endémica em Portugal e cada vez mais diagnosticada. Uma vacina contra uma doença tão grave como a LCan evita tratamentos dispendiosos, o sofrimento do animal e dos seus donos e o risco que estes correm de serem infetados.

Os médicos veterinários têm o papel fundamental no alerta e informação dos proprietários sobre a prevalência, importância e gravidade da doença e sobre as formas de prevenção existentes e a disponibilidade de uma vacina eficaz. A comunicação com o proprietário é um fator chave para atingir o sucesso na persuasão dos donos a optarem por esta vacina.

Agora, os médicos veterinários têm o controlo da prevenção contra a LCan através da vacinação, um ato médico que traz valor acrescentado e é uma excelente oportunidade para



a clínica pois fortalece os laços de lealdade, fidelizando os clientes, garante o cumprimento ao não deixar a prevenção nas 'mãos' do proprietário, aumenta as receitas dos CAMV's, gerando mais visitas durante o ano e possíveis vendas cruzadas.

Com o objetivo de ajudar na captação de mais visitas aos CAMV's para a prevenção da LCan, a Virbac de Portugal enviou eletronicamente para os médicos veterinários registados no *site* [www.virbac.pt](http://www.virbac.pt), a comunicação 'Pharmaco-economics: a cost analysis between treatment and vaccination of canine leishmaniosis' apresentado no 12<sup>th</sup> EAVPT Congress, como uma ferramenta de comunicação para utilização em *mailings*, *e-mailings* ou *posts* nas redes sociais.

A referência à comunicação também foi incluída num folheto informativo dirigido ao proprietário sobre as consequências decorrentes de não se prevenir a Leishmaniose, em que se pretendeu reforçar o interesse económico da prevenção *versus* tratamento: "Os casos de doença, se não forem tratados, podem ser fatais. Os tratamentos permitem controlar os sintomas mas não curam a doença. São no entanto muito dispendiosos, em média 4 a 5 vezes mais caros que a vacinação." (Anexo 3) (Marketing Virbac Leishmaniose/ Informação ao proprietário/ Edição Portugal 2013).

A publicação anteriormente citada também foi traduzida e utilizada pelas filiais europeias da Virbac S.A, para ajudar tanto a Força de Vendas com mais um instrumento na promoção da vacina, como os próprios médicos veterinários a convencer um maior número de proprietários a proteger os seus cães de uma forma mais eficaz com CaniLeish®. Até há pouco tempo, os médicos veterinários utilizavam fatores médicos, epidemiológicos e emocionais para promover a prevenção através da vacinação. Com esta publicação têm um novo argumento para fomentar a vacinação, em particular para esclarecer os clientes com baixos recursos económicos pela comparação entre o investimento da vacinação contra os custos elevados associados a um tratamento que não permite obter a cura parasitológica do animal, é prolongado no tempo e muito dispendioso em que dinheiro, tempo, esforço e dor emocional são empregues. Assim, para além de proporcionarem suporte à decisão clínica, as avaliações farmacoeconómicas podem ser utilizadas como um instrumento de informação e sensibilização junto aos clientes.

#### **4. CONCLUSÃO**

Uma visão moderna da gestão dos recursos disponíveis para a saúde requer o estudo dos fatores implicados nos custos e benefícios das diferentes opções existentes. Como os medicamentos são as armas terapêuticas mais utilizadas, é indispensável realizar uma análise adequada e completa de como tais fatores influenciam as alternativas médicas disponíveis. Por estas razões desenvolveu-se a farmacoeconomia, disciplina que se encarrega de relacionar custos e benefícios dos tratamentos farmacológicos, permitindo optar pela melhor alternativa de uma forma objetiva e racional, otimizando os recursos

económicos disponíveis para as ações de saúde, que, em última análise representam os melhores interesses do paciente, do sistema de saúde e da sociedade.

A farmacoeconomia representa um valioso instrumento de apoio na tomada de decisões, melhores e mais informadas, relativamente aos produtos e serviços fornecidos. Tradicionalmente, a maioria das decisões terapêuticas eram baseadas unicamente nos resultados dos estudos de segurança e de eficácia, sendo que ao longo dos últimos 20 anos a farmacoeconomia tornou-se bastante popular ao introduzir, no cenário da saúde, um novo critério – o económico – na escolha de alternativas terapêuticas.

Assim, os estudos farmacoeconómicos proporcionam informação sobre a eficiência das alternativas terapêuticas utilizadas para tratar as diferentes doenças, promovendo a transparência e estabelecendo critérios objetivos no processo de tomada de decisão.

Os animais têm um papel de destaque nas famílias portuguesas, contudo e muito devido à crise económica atual, o que se verifica com frequência é que as famílias acabam por não conseguir aceder a certos tratamentos veterinários por ser de todo incomportável para o equilíbrio financeiro do agregado familiar. Assim, e devido às claras restrições económicas existentes e consequentemente à impossibilidade de muitos proprietários em suportar a totalidade dos custos relacionados com o tratamento necessário para a doença, cabe ao médico veterinário fazer uma seleção das alternativas terapêuticas existentes consoante os recursos financeiros disponíveis por parte dos proprietários.

No contexto atual, a farmacoeconomia tem-se convertido numa ferramenta essencial na tomada de decisão, contudo, a utilização correta dos seus termos e o conhecimento da sua metodologia são pré-requisitos imprescindíveis à aplicação e interpretação dos resultados. O grande desafio dos médicos veterinários é aplicar os instrumentos farmacoeconómicos, ajustados da medicina humana para a saúde animal, às questões quotidianas da atividade clínica e superar as dificuldades relativas à identificação, cálculo e comparação dos custos e resultados.

Assim, a sensibilização/formação dos estudantes em farmacoeconomia é fundamental e necessária, assumindo vital importância, já que, sendo estes prescritores futuros, cabe-lhes a responsabilidade de selecionar medicamentos com base em segurança, tolerância /adequação, eficácia e preço. A educação no ensino superior não deverá ser apenas puramente técnica visando o conhecimento das doenças e dos seus tratamentos, mas deverá implicar também a compreensão de questões sócio-económicas e, como médicos veterinários deverá ser nossa necessidade e prioridade a procura contínua de formação e informação que contribuam para um aperfeiçoamento e reconhecimento da nossa profissão. Relativamente ao estudo desenvolvido, como a adesão/ *compliance* por parte do proprietário é influenciada por fatores, tais como, o preço, inconvenientes administrações diárias e recaídas clínicas frequentes, pode-se concluir que a vacinação com Canileish®, para além do seu importante papel na proteção do animal contra a Leishmaniose e permitir uma

melhor *compliance*, é também muito mais económica. O médico veterinário deverá sensibilizar o proprietário para o custo da doença quer a nível de diagnóstico, quer a nível do tratamento, e consciencializá-lo de que a cura total não existe, mas apenas a remissão da sintomatologia, pelo que poderão ocorrer recidivas.

A avaliação farmacoeconómica é cada vez mais relevante para a prática clínica, pois atua como uma ferramenta essencial no processo de tomada de decisão, contribuindo para uma utilização mais eficaz, racional e eficiente de produtos farmacêuticos, serviços ou recursos ao menor custo.

Assim, apesar de a farmacoeconomia ainda ser uma disciplina em evolução, espera-se que haja, num futuro próximo, uma maior inclusão dos estudos farmacoeconómicos no campo da Medicina Veterinária.

## CAPÍTULO V - BIBLIOGRAFIA

- Alexander, B. & Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17 (1), 1-18.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1–88.
- Álvarez, J. (2001). Estudios de farmacoeconomía: ¿por qué, cómo, cuándo y para qué? *Medifam*, 11 (3), 147-155. Acedido em Jan. 3, 2013, disponível em: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1131-57682001000300004](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682001000300004)
- Araújo, M.S., de Andrade, R.A., Vianna, L.R., Mayrink, W., Reis, A.B., Sathler-Avelar, R., Teixeira-Carvalho, A., Andrade, M.C., Mello, M.N. & Martins-Filho, O.A.(2008). Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 26 (18), 2211-24.
- Armés, S.M.C. (2010). *Rastreo de Leishmania infantum em cães assintomáticos na região de Mafra*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Ballou, W.R. (2009). The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite Immunology*, 31 (9), 492-500.
- Baneth, G. (2002). A review of the treatment of canine leishmaniasis [versão electrónica], *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*, Sevilla, Spain, pp. 15-19. Acedido em Set. 24, 2012, disponível em: <http://www.studioveterinariosanrocco.it/Atti%202nd%20Int%20CanL%20Forum%20Siviglia%202002.pdf>
- Baneth, G. & Shaw, S.E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 106 (4), 315-324.
- Baneth, G. & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal*, 175 (1), 14-15.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. *Trends in Parasitology*, 24 (7), 324-330.
- Baneth, G. (2010). Canine Leishmaniasis. *Proceedings of the 35th World Small Animal Veterinary Congress*, Geneva, Switzerland. Acedido em Set. 29, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/d11.pdf>
- Barbiéri, C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28 (7), 329-337.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37 (10), 1097–1106. Acedido em Set. 26, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675784/>
- Boceta, C., Alonso, C. & Jimenez-Ruiz, A.(2000). Leucine rich repeats are the main epitopes in *L. infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite immunology*, 22 (2), 55–62.

- Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Santos, F.B., Trivellato, F.A., Kawasaki, J.K., Costa, A.C., Castro, T., Nogueira, F.S., Moreira, M.A., Luvizotto, M.C., Palatnik, M. & Palatnik-de-Sousa, C.B. (2010). Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 28 (3), 597-603.
- Bourdeau, P.J. (2009). Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized management. *Proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium, Bled, Slovenia*, pp. 10-27.
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q. & Varela, M.C. (1999). *Parasitología Veterinaria*. (pp. 651-665). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O. & Dedet, J.P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine & International Health*, 11 (11), 1708-14. Acedido em Out. 17, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x/pdf>
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23 (5), 859-864. Acedido em Set. 12, 2012, disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2010-23/5/859-864.pdf>
- Campino, L. (2012, 5 de Junho). Leishmaniose Canina em Portugal. *Cães e Companhia*, pp. 34-35.
- Canine Leishmaniasis Working Group (2007). Canine Leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention - Part I. Acedido em Out. 7, 2012, disponível em: [www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria\\_2007\\_eng.pdf](http://www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria_2007_eng.pdf)
- Carrillo, E. & Moreno, J. (2009). Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128 (1-3), 67-70.
- Castanheira, A.R., Moreira da Silva, J. & São Braz, B. (2012). Pharmaco-economics: a cost analysis between treatment and vaccination of canine leishmaniosis, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35 (3), 128-129. Acedido em Mar. 3, 2013, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.12006/pdf>
- Chauvin, C., Madec, F., Guittet, M. & Sanders, P. (2002). Pharmaco-epidemiology and -economics should be developed more extensively in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Therap*, 25, 455-459.
- Chene, J., Bourdoiseau, G., Chabanne, L. *et. al.* (2010). Comparison of a rapid immunochromatographic test with immunofluorescence assay for the detection of anti-*L. infantum* antibodies in dogs. In *2nd Congresso Internazionale SCIVAC: Leishmaniosi canina*, Pisa, Italy, April 2010.
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003a). Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects therapeutic aspects. *Compendium*, 25 (5), 358-369. Acedido em Nov. 19, 2012, disponível em: [http://cp.vetlearn.com/media/publicationsarticle/pv\\_25\\_05\\_358.pdf](http://cp.vetlearn.com/media/publicationsarticle/pv_25_05_358.pdf)
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003b). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. *Compendium*, 25 (5), 370-375.

- Cornez, B. (2009). Capítulo X: Essential elements of veterinary pharmacovigilance and the role and duties of the Qualified Person. In K.N. Woodward (Eds.), *Veterinary Pharmacovigilance Adverse Reactions to Veterinary Medicinal Products*, (pp. 177-208). West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Cortadellas, O., del Palacio, M.J., Bayon, A., Albert, A. & Talavera, J. (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (4), 941–947.
- Cortadellas, O., del Palacio, F.M.J., Talavera, J. & Bayón, A. (2008). Glomerular Filtration Rate in Dogs with Leishmaniasis and Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22 (2), 293–300.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (9), 1431–1432. Acedido em Dez. 24, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857284/>
- Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology*, 141 (1-2), 1-8.
- Dantas-Torres, F. & Brandão-Filho, S.P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48 (3), 151–156. Acedido em Out. 12, 2012, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46652006000300007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46652006000300007&script=sci_arttext)
- Day, M.J. (2007). Immune System Development in the Dog and Cat. *Journal of Comparative Pathology*, 137 (1); 10-15.
- Day, M.J. (2011). The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 4 (48). Acedido em Dez. 2, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090743/>
- DeSanVicente-Célis, Z., Salazar, J., Pineda-Tamayo, R. & Anaya, J. (2011). Sobre la necesidad de la farmacoconomía. Comenzar por los principios. *Revista Colombiana de Reumatología*, 18 (3), 187-202. Acedido em Jan. 3, 2013, disponível em: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-81232011000300005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-81232011000300005)
- Despacho do Ministério da Saúde n.º 19 064/99, de 9 de Setembro. (DR, 2.ª série, n.º 233, de 6 de Outubro de 1999). INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso. Acedido em Jan. 7, 2013, disponível em: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/LEGISLACAO/LEGISLACAO\\_FARMACEUTICA\\_COMPILADA/TITULO\\_IV/despacho\\_19064-99.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/LEGISLACAO/LEGISLACAO_FARMACEUTICA_COMPILADA/TITULO_IV/despacho_19064-99.pdf)
- Devault, A. & Banuls, A.L. (2008). The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 292-306. Acedido em Set. 11, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2584048/?tool=pubmed>
- Díaz, M., Andrés, J. & Carrera-Huesoc, F. (2011). Aplicación de la farmacoconomía en la gestión clínica. *Farmacia Hospitalaria*, 35 (2), 18-24. Acedido em Feb. 13, 2013, disponível em: [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet? f=10&pidet\\_articulo=90117356&pidet\\_usuario=0&pcontactid=&pidet\\_revista=121&ty=14&accion=L&origen=elsevier&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=121v35nSupl.2a90117356pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet? f=10&pidet_articulo=90117356&pidet_usuario=0&pcontactid=&pidet_revista=121&ty=14&accion=L&origen=elsevier&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=121v35nSupl.2a90117356pdf001.pdf)

- Dos-Santos, W.L., Jesus, E.E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A.M., Santos, J.C., Baleeiro, C.O., Nascimento, E.G., Moreira, E.D., Oliveira, G.G. & Pontes de-Carvalho, L.C. (2008). Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123 (3-4), 251–259.
- Egger, C., Glerum, L., Haag, K. & Rohrbach, B. (2007). Efficacy and cost-effectiveness of transdermal fentanyl patches for the relief of post-operative pain in dogs after anterior cruciate ligament and pelvic limb repair (abstract). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 34 (3). Acedido em Mar. 20, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444933>
- El-Tahawy, A. & Fahmy, M. (2011). Partial budgeting assessment of the treatment of pyometra, follicular cysts and ovarian inactivity causing postpartum anoestrus in dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 90 (1), 44-50.
- European Medicines Agency (2011a). CaniLeish – Resumo das Características do Medicamento. EMEA/V/C/002232. Acedido em Ago. 3, 2012, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/veterinary/002232/WC500104954.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/002232/WC500104954.pdf)
- European Medicines Agency (2011b). CaniLeish: EPAR - Public assessment report. EMA/CVMP/296057/2010. Acedido em Ago. 3, 2012, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/veterinary/002232/WC500104953.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/veterinary/002232/WC500104953.pdf)
- European Medicines Agency (2011c). CaniLeish: EPAR – Summary for the public. EMA/296055/2010. Acedido em Ago. 3, 2012, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/veterinary/002232/WC500104955.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/002232/WC500104955.pdf)
- Faria, T.C.P. (2008). *Estudo sero-epidemiológico da infecção por Leishmania infantum em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferrer, L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, 28-31 January*, pp. 6-10.
- Ferraz, F. (2012). Leishmaniose Felina e Canina: As novas armas no combate à doença. *Veterinária Atual*, n.º51, pp. 14-17.
- Ferrer, L. (2011). Treatment was successful... What next? In *Proceedings of Southern European Veterinary Conference Symposium: Advanced management of Canine Leishmaniosis*, Barcelona, Spain, 30 September 2011, pp. 22-23.
- Ferroglio, E., Maroli, M., Gastaldo, S., Mignone, W. & Rossi, L. (2005). Canine leishmaniasis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), 1618-20. Acedido em Nov. 16, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366729/>
- Foglia, M., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M. & Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, 142 (1-2), 142-145.

- Garrido, J.B.G. (2012). *Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por Leishmania infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Gavvani, A.S., Mohite, H., Edrissian, G.H., Mohebbali, M. & Davies, C.R. (2002). Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67 (5), 511-515. Acedido em Nov. 25, 2012, disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/67/5/511.full.pdf+html>
- Gavvani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H. & Davies, C.R. (2002). Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*, 360 (9330), 374-379.
- Goldman, M. & Nair, R. (2007) Antibacterial treatment strategies in hospitalized patients: What role for pharmacoeconomics? *Cleveland Clinic Journal Of Medicine*, 74 (4), 38-47. Acedido em Fev. 23, 2013, disponível em: [http://www.ccjm.org/content/74/Suppl\\_4/S38.long](http://www.ccjm.org/content/74/Suppl_4/S38.long)
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G. & Alves, L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary Journal*, 175 (1), 45-52.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F. & Couto, C.G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Veterinary Journal*, 179 (2), 259-263.
- Gradoni, L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology*, 100 (1-2), 87-103.
- Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T. & Oliva, G. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *L. infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, 23 (45), 5245-5251.
- Gramiccia, M. Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35 (11-12), 1169-1180.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181 (1), 23-30.
- Greene, C.E. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th edition). (pp.735-749). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Guichon, P.T., Jim, G.K., Booker, C.W., Schunicht, O.C., Wildman, B.K. & Brown, J.R. (2000). Relative cost-effectiveness of treatment of feedlot calves with ivermectin versus treatment with a combination of fenbendazole, permethrin, and fenthion. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216 (12), 1965-1969.
- Herrera, M. & Balbín, N. (2001). La farmacoeconomía en la industria farmacéutica y el sistema sanitario de Cuba. *Rev Panam Salud Publica*, 10 (4), 263-267. Acedido em Fev. 24, 2013, disponível em: <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v10n4/6769.pdf>



- Herrera, M. (2004). Farmacoeconomía. Eficiencia y uso racional de los medicamentos. *Rev. Bras. Cienc. Farm*, 40 (4), 445-453. Acedido em Jan. 25, 2013, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n4/v40n4a02.pdf>
- Jiménez-Ruiz, A., Boceta, C., Bonay, P., Requena, J.M. & Alonso, C. (1998). Cloning, sequencing and expression of the PSA genes from *L. infantum*. *European Journal of Biochemistry*, 251 (1-2), 389-397. Acedido em Jul. 5, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.1998.2510389.x/pdf>
- Kamal, S.M. & El, Sayed Khalifa K. (2006). Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunology*, 28 (10), 483-496.
- Kazerooni, R. (2009). Introduction to Pharmacoeconomics. *California Journal of Health-System Pharmacy*, 21 (6), 21-30.
- Kedzierski, L., Montgomery, J., Bullen D., Curtis, J., Gardiner, E., Jimenez-Ruiz, A. & Handman, E. (2004). A Leucine-Rich Repeat Motif of *Leishmania* Parasite Surface Antigen 2 Binds to Macrophages through the Complement Receptor 3. *Journal of Immunology*, 172(8), 4902-4906.
- Kensil, C.R. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13 (1-2) 1-55.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand Flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3), 279–289.
- Kozma, C., Reeder, C. & Schulz, R. (1993). Economic, clinical, and humanistic outcomes: A planning model for pharmacoeconomic research. *Clinical Therapeutics*, 15 (6), 1121–1132.
- Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F. Jr & Gause, W.C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*, 19 (4), 448-453. Acedido em Nov. 24, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2000338/?tool=pubmed>
- Kulkarni, U., Dalvi, K., Moghe, V. & Deshmukh, Y. (2009). Pharmacoeconomics: An emerging branch in health sciences for decision making. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3 (8), 362-367.
- Kumar, R., Goto, Y., Gidwani, K., Cowgill, K.D., Sundar, S. & Reed, S.G. (2010). Evaluation of ex vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82 (5), 808-813. Acedido em Ago. 18, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2861380/?tool=pubmed>
- Lemesre, J.L. (1993). Patent Application number FR 2 705 358 – A1. Procédé de culture in vitro de différents stades de parasites tissulaires obtenus et applications biologiques.
- Madeira, M., Schubach, A., Schubach, T., Pereira, S., Figueiredo, F., Baptista, C., Leal, C., Melo, C., Confort, E. & Marzochi, M. (2006). Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 138, 366–370.
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158 (4), 274-787.

- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F. & Gravino, A.E. (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with Leishmaniosis. *Veterinary Journal*, 182 (3), 441-445.
- Maroli, M., Mizzon, V., Siragusa, C., D'Oorazi, A. & Gradoni, L. (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, 15 (4), 358-363.
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Lubas, G., Paltrinieri, S., Roura, X., Zini, E. & Zatelli, A. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (11), 1200-1206.
- Marques, A.C.F. (2008). *O medicamento veterinário em Portugal: do registo à comercialização*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O. & Altet, L. (2011). Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors*, 4, 57. Acedido em Out. 14, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086858/>
- Martins, T.S.O. (2011). *Detecção de Ehrlichia spp./Anaplasma spp., Rickettsia spp., Mycoplasma haemofelis e Leishmania infantum em felinos errantes e sua relação com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- McGahie, D. (2011a). CaniLeish: Development of a new preventive tool. How do you produce a vaccine which really works? *In Proceedings of Southern European Veterinary Conference Symposium: Advanced management of Canine Leishmaniosis*, Barcelona, Spain, 30 September 2011, pp. 13-14.
- McGahie, D. (2011b). Results of safety trials with CaniLeish. What can be expected? *In Proceedings of Southern European Veterinary Conference Symposium: Advanced management of Canine Leishmaniosis*, Barcelona, Spain, 30 September 2011, pp. 15-16.
- Meireles, J.A.F.S. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da Leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 93-103). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Mekuzas, Y., Gradoni, L., Oliva, G., Foglia Manzillo, V. & Baneth, G. (2009). *Ehrlichia canis* and *L. infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clinical Microbiology Infection*, 15 (2), 30-31.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L. & Dias, E.S. (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sandflies. *Veterinary Parasitology*, 2007; 147 (1-2), 67- 76.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371-377.

- Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C. & Bianciardi, P. (2009). Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 397-404.
- Molina, R., Espinosa-Góngora, C., Gálvez, R., Montoya, A., Descalzo, M.A., Jiménez, M.I., Dado, D. & Miró, G. (2012). Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Parasitology*, 187 (3-4), 529-533.
- Moreira, M., Luvizotto, M., Garcia, J., Corbett, C. & Laurenti, M. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), 245-252.
- Moreno, J. & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18 (9), 399-405.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A.M. & Gueguen, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (Canileish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (6), e1683. Acedido em Dez. 3, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3378610/?tool=pubmed>
- Mori, M. & Gotoh, T. (2004). Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *The Journal of Nutrition*, 134 (10), 2820-2825. Acedido em Dez. 10, 2012, disponível em: <http://jn.nutrition.org/content/134/10/2820S.long>
- Mota, D. (2003). Avaliação Farmacoeconômica: Instrumentos de Medida dos Benefícios na Atenção Farmacêutica. *Acta Farm. Bonaerense*, 22 (1), 73-80. Acedido em Fev. 4, 2013, disponível em: <http://www.ppgge.ufrgs.br/GIACOMO/arquivos/eco02072/mota-2003.pdf>
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. & Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366, 1561-1577.
- Noël, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P. & Beschin, A. (2004). Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*, 20 (3), 126-133.
- Noli, C. & Auxilia, S.T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, 16(4), 213-232.
- Observatório Nacional das Leishmanioses [ONLeish] (2011). Primeiro relatório regular da LEISHnet. *Veterinary Medicine*, 13 (73), 31-36.
- Observatório Nacional das Leishmanioses [ONLeish] (2012). Acedido em Nov. 9, 2012, disponível em: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>
- Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A. & Zini, E. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (11), 1192-1198.
- Ortega, A. (n.d.). Farmacoeconomía. *Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*. Acedido em Mar. 11, 2013, disponível em: [http://sefh.interguias.com/libros/tomo1/Tomo1\\_Cap2-11.pdf](http://sefh.interguias.com/libros/tomo1/Tomo1_Cap2-11.pdf)
- Palatnik-de-Sousa, C.B., Silva-Antunes, I., Morgado Ade, A., Menz, I., Palatnik, M. & Lavor, C. (2009). Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis

- after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. *Vaccine*, 27 (27), 3505-12.
- Palatnik-de-Sousa, C.B. & Day, M.J. (2011). One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4:197. Acedido em Nov. 27, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3214158/>
- Palatnik-de-Sousa, C.B. (2012). Vaccines for Canine Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3:69. Acedido em Out. 15, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342354/>
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A. & Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (11), 1184-91.
- Pereira, M.A.M. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 41-51). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 83-92). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Petersen, C.A. (2009). Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24 (4), 182-188. Acedido em Set. 19, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2805016/>
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G. & Ruitenbergh, J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *L. infantum*. *Infection and Immunity*, 62 (1), 229-235. Acedido em Out. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186091/?tool=pubmed>
- Pugliese, A., Di Pietro, S. & Giudice, E. (2006). Clinical and Diagnostic Patterns of Leishmaniasis in the Dog. *Veterinary Research Communication*, 30 (1), 39-43.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C. and Day, M.J. (2003a). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(3-4), 161-168.
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W. & Ollier, W.E. (2003b). Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55(1), 23-28.
- Ramos, C.P.G. (2012). *A importância da infecção por Leishmania spp. e Dirofilaria immitis em gatos na região de Olhão*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Ready, P.D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveillance*, 15 (10), 19505. Acedido em Nov. 28, 2012, disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19505>
- Resumo das Características do Medicamento Milteforan®. (2007). Disponível em: <http://www.apifarma.pt/sites/simpvetgest/Lists/Medicamentos/Milteforan.pdf>

- Resumo das Características do Medicamento Leisguard®. (2012). Disponível em: <http://www.apifarma.pt/sites/simpvetgest/Lists/Medicamentos/Leisguard.pdf>
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., & Jaffe, C.L. (1999). Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71(1), 69–76.
- Rosa, R., Rodrigues, O.R., Marques, C. & Santos-Gomes, G.M. (2005). *L. infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. *Experimental Parasitology*, 109 (2), 106-114.
- Rosa, N.G.C. (2009). *Rastreo de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da Área Metropolitana de Lisboa*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Roze, M. (2005). Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 15 (1), 39-52.
- Sacristán, J., Soto, J., Reviriego, J. & Galende, I. (1994). Farmacoeconomía: el cálculo de la eficiencia. *Med Clin (Barc)*, 103 (4), 143-149. Acedido em Jan. 26, 2013, disponível em: <http://www.farmacoeconomia.com/pdf/EvaluacionIntervencionesSanitarias.pdf>
- Santos-Gomes, G.M., Rosa, R., Leandro, C., Cortes, S., Romão, P. & Silveira, H. (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection with *L. infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88 (1-2), 21-30.
- Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Billinis, C., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Gouletsou, P., Diakou, A. & Kontos, V.I. (2005). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Veterinary Parasitology*, 130 (3-4), 199-205.
- Saridomichelakis, M.N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20 (5-6), 471-89.
- Schunicht, O.C., Guichon, P.T., Booker, C.W., Jim, G.K., Wildman, B.K., Ward, T.I., Bauck, S.W. & Gross, S.J. (2000). Comparative cost-effectiveness of ivermectin versus topical organophosphate in feedlot yearlings. *The Canadian Veterinary Journal*, 41 (3), 220-224. Acedido em Mar. 19, 2013, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1476312/>
- Secoli, S., Padilha, K., Litvoc, J. & Maeda, S. (2005). Farmacoeconomia: perspectiva emergente no processo de tomada de decisão. *Ciência e Saúde Coletiva*, 10 (sup), 287-296. Acedido em Fev. 2, 2013, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232005000500029](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232005000500029)
- Semião-Santos, S.J., El Harith, A., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C. & Gusmão, R. (1995). Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research*, 81 (3), 235–239.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45 (4), 255-72. Acedido em Nov. 29, 2012, disponível em: <http://www.mrcindia.org/journal/issues/454255.pdf>
- Shaw, S.E. & Day, M.J. (2005). *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (pp. 89-99). London: Manson Publishing.



- Shaw, S.E., Lerga, A.I., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R.J., Day, M.J. & Kenny, M.J. (2003). Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *The Veterinary Record*, 152 (6), 176–177.
- Silva, I.P.C. (2011). *Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil, Setúbal, Portugal*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Sjölander, A., Baldwin, T. M., Curtis J.M., Bengtsson, K.L. & Handman, E. (1998). Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine*, 16 (20), 2077-2084.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 18 (3), 232-241.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis, *Veterinary Parasitology*, 165 (1-2), 1-18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4:86. Acedido em Out. 8, 2012, Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125381/>
- Sumano, L.H., Ocampo, C.L., Brumbaugh, G.W. & Lizarraga, R.E. (1998). Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. *British Poultry Science*, 39, 42–46.
- Sun, H., Xie, Y. & Ye, Y. (2009) Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27 (12), 1787-1796.
- Teske, E., van Knapen, F., Beijer, E.G. & Slappendel, R.J. (2002). Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43 (4), 195–201. Acedido em Out. 22, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225831/>
- Tonon, L., Tomo, T. & Secoli, S. (2008). Farmacoeconomia: análise de uma perspectiva inovadora na prática clínica da enfermeira. *Texto & Contexto - Enfermagem*, 17 (1), 177-82. Acedido em Mar. 24, 2013, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-07072008000100020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-07072008000100020&script=sci_arttext)
- Trask, L. (2011). Chapter 1 - Pharmacoeconomics: Principles, Methods, and Applications. The McGraw-Hill Companies. Acedido em Fev. 9, 2013, disponível em: [http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/007147899x/603552/Pharmacotherapy\\_chap001.pdf](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/007147899x/603552/Pharmacotherapy_chap001.pdf)
- Velásquez, G. (1999). Farmacoeconomía: ¿evaluación científica o estrategia comercial? *Revista Panamericana de Salud Pública*, 5(1), 57-57. Acedido em Fev. 2, 2013, disponível em: [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1020-49891999000100018](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49891999000100018)
- Vidal, A.C.V. (2013). *Rastreio de agentes de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães com funções militares e policiais*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

- Virbac. (2009). Milteforan® Perguntas e Respostas mais frequentes. Virbac Animal Health.
- Virbac. (2011). CaniLeish. Technical Product Profile. Virbac Animal Health.
- Volf, P., Hostomska, J. & Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in Leishmania-sandfly-host relationships. *Parasite*, 15 (3), 237–243.
- Vulpiani, M. Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F. & Ferri, N. (2011). Methods of Control of the Leishmania infantum Dog Reservoir: State of the Art. *Veterinary Medicine International*, Volume 2011, Article ID 215964. Acedido em Nov. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134973/>
- Wall, P.L., Nelson, L.M. & Guthmiller, L.A. (1996). Cost effectiveness of use of a solution of 6% dextran 70 in young calves with severe diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209 (10), 1714-1715.
- Werneck, G.L., Costa, C.H., Walker, A.M., David, J.R., Wand, M. & Maguire, J.H. (2006). Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection*, 135, 195-201.
- World Health Organization [WHO]. (2012). *World Health Organization: Leishmaniasis: Background Information*. Acedido em Dez. 27, 2012, disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- Xavier, S., Andrade, H., Haddad, S., Chiarelli, I., Lima, W., Michalick, M., Tafuri, W. & Tafuri, W. (2006). Comparison of paraffinembedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*, 2, 17. Acedido em Set. 28, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1553440/>

## CAPÍTULO VI - ANEXOS


**Anexo 1** - Comunicação em painel exibida no 12º Congresso Internacional da Associação Europeia de Farmacologia e Toxicologia Veterinária (EAVPT).

# Pharmacoeconomics: A Cost Analysis Between Treatment And Vaccination Of Canine Leishmaniosis



A.R.CASTANHEIRA<sup>1</sup>, J. MOREIRA DA SILVA<sup>2</sup> & B. SÃO BRAZ<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Sector of Pharmacology and Toxicology, Interdisciplinary Centre of Research in Animal Health (CIISA), Faculty of Veterinary Medicine (FMV), Technical University of Lisbon (UTL), Lisbon, Portugal [rita.fcastanheira@gmail.com; bsaobraz@fmv.utl.pt]; <sup>2</sup>Virbac de Portugal Laboratórios, Lda, Sintra, Portugal [jorge.moreira@virbac.pt]

**Key Words:** Leishmaniosis, vaccine, pharmacoeconomics



## INTRODUCTION

Canine Leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* is a chronic and fatal disease that is widespread in Europe, Africa, Asia and America regions. This zoonosis affects at least 2.5 million dogs in South-Western Europe alone and is spreading to non endemic areas causing a serious public health problem (Baneth, 2008).  
For the first time in Europe, a vaccine with specific action against Leishmaniosis is available. CaniLeish® (from Virbac S.A) is indicated for use in Leishmania negative dogs from six months of age to reduce the risk of developing active infection and clinical disease after contact with the parasite (Virbac, 2011).  
The purpose of this research was to analyze the costs between treatment and vaccination of Canine Leishmaniosis as an example of pharmacoeconomic assessment in the veterinary field.

## RESULTS

The total costs of treatment with meglumine antimoniate/ allopurinol and miltefosine/allopurinol were respectively 3.5 and 3.6 times more expensive than the CaniLeish® vaccination, and didn't include symptomatic therapy costs such as antibiotics, anti-inflammatory drugs, fluidtherapy, and renal support or hypoproteic special diets.

	CaniLeish vaccination	Meglumine Antimoniate/Allopurinol treatment	Miltefosine/Allopurinol treatment
Total costs	508 €	1772 €	1836 €

x 3.5      x 3.6

## MATERIALS AND METHODS

Calculations were made with an universal worksheet software (Microsoft Excel) and a 20kg dog weight and age of 2 years old was considered. Treatment protocols with meglumine antimoniate (100mg/kg SID 30 days SC) or miltefosine (2mg/kg SID 28 days PO) both combined with allopurinol (10mg/kg BID 6 months PO) were adopted on the cost analysis (Solano-Gallego, 2011).  
Treatment costs included the diagnostic methods (biochemical profile, a rapid test Speed Leish K™, the 'gold standard' quantitative serology IFAT), clinical follow-ups (biochemical profile and IFAT) and relapses. Three recurrences of the disease and the animal's death at age of 7 years were considered. The CaniLeish® vaccination primary course consists of three injections given at three week intervals, with annual re-vaccination. It was considered that the dog was vaccinated up to 10 years.  
Pre vaccination screening with a rapid test Speed Leish K™ was also included in costs.

## CONCLUSIONS

As the pet owner's compliance is influenced by factors like price, inconvenient daily administrations and frequent clinical relapses, it can be concluded that the CaniLeish® vaccination besides its important role on the animal's protection against Leishmaniosis and better owner compliance, is also much more economic.  
Pharmacoeconomic evaluation is increasingly relevant to the clinical practice because acts as an essential tool in the decision-making process, contributing to a more effective, rational and efficient use of pharmaceutical products, services or resources at the lowest cost.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We want to acknowledge the FMV/UTL and Virbac de Portugal Laboratórios, Lda, for supporting this work.

### REFERENCES

Baneth, G., et al. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. Trends in Parasitology, Vol. 24, n. 7, pp. 324-330.  
Virbac (2011). CaniLeish. Technical Product Profile. Virbac Animal Health.  
Solano-Gallego, L., et al. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasites & Vectors, 4:86.



**Anexo 2** - Desenvolvimento do estudo ‘Análise de custos comparada entre o tratamento e a vacinação da Leishmaniose Canina’

Os cálculos foram realizados tendo como base um canídeo, com **2 anos de idade** e com pesos vivos de **10 kg, 20 kg e 30 kg de peso**, pesos representativos das raças pequena, média e grande. Os **preços** dos medicamentos, e outros produtos, considerados nesta análise foram os preços de venda ao público (PVP) gentilmente cedidos pelo Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL).

**Tabela 1** - Preços considerados para cálculos

	<b>Item</b>	<b>Custo (€)</b>
Serviços Médico-Veterinários	Speed Leish K™	13,05
	Imunofluorescência Indireta (IFI)	26,43
	Análises bioquímicas (hemograma; ALT; FAS; ureia/creatinina; urianálise; proteinograma)	63,24
	Consulta	28,70
Medicamentos Farmacológicos	Glucantime® (ampola 5ml)	3,57
	Milteforan® (frasco 30ml)	84,82
	Milteforan® (frasco 60ml)	155,36
	Milteforan® (frasco 90ml)	212,82
	Alopurinol (comprimido)	0,17
Medicamentos Imunológicos	Canileish® – Primo-vacinação (Speed Leish K™ + 3 doses)	148,05
	Canileish® – Reforço Anual	45,00

## CÁLCULO DE CUSTOS

### 1 - Custos de Vacinação

O protocolo de **primo-vacinação** com Canileish® consiste na administração por via subcutânea de 3 doses com 3 semanas de intervalo, sendo posteriormente realizada a revacinação anual. O rastreio pré-vacinal com o teste rápido Speed Leish K™ também foi incluído nos custos. Estipulou-se que o cão foi vacinado até aos 10 anos, pelo que se considerou a primo-vacinação e 8 revacinações. De notar que o custo é independente do peso do animal.

**Tabela 2** - Custos de Vacinação

<b>Item</b>	<b>Cálculos Intermédios</b>	<b>Custos (€)</b>
Primo-vacinação + Speed Leish K™		148,05
Revacinações	8 × 45,00	360,00
		Total: 508,05

## 2 - Custos de Tratamento

Os protocolos de **tratamento** adotados seguiram as linhas-diretrizes elaboradas pelo grupo LeishVet (Tabela 3). Assim, para o efeito contabilizaram-se os custos do antimonio de meglumina (100 mg/kg SID durante 30 dias SC) ou da miltefosina (2mg/kg SID durante 28 dias PO) ambos combinados com o alopurinol (10 mg/kg BID durante 6 meses PO).

**Tabela 3** - Protocolos atuais no tratamento da LCan

Fármacos	Doses
Antimonio de Meglumina (Glucantime®)	75-100mg/kg SID ou 40-75mg/kg BID durante 4 semanas SC (pode ser prolongado 2-3 semanas se animal não melhorar)
Miltefosina (Milteforan®)	2mg/kg SID durante 28 dias PO
Alopurinol	10mg/kg BID no mínimo durante 6-12 meses PO

Legenda: SID, uma vez por dia; BID, duas vezes por dia; SC, via subcutânea; PO, *per os*.

### 2.1. Cálculos

**Tabela 4** - Custos de tratamento com Glucantime, Milteforan e Alopurinol

A - GLUCANTIME			
Peso animal (kg)	Dados	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	<u>Protocolo:</u> 100mg/kg SID 30 dias SC  <u>Preço por ampola:</u> 3,57€  Cada ampola de 5ml tem 1,5g de substância ativa	$3,57 \times 0,67 \times 30$  C.A.: $100mg \times 10kg = 1000mg = 1g$  $\frac{1g}{1,5g} = 0,67 \text{ ampola}$	71,76
20		$3,57 \times 1,3 \times 30$  C.A.: $100mg \times 20kg = 2000mg = 2g$  $\frac{2g}{1,5g} = 1,3 \text{ ampola}$	139,23
30		$3,57 \times 2 \times 30$  C.A.: $100mg \times 30kg = 3000mg = 3g$  $\frac{3g}{1,5g} = 2 \text{ ampolas}$	214,20
B - MILTEFORAN			
Peso animal (kg)	Dados	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	<u>Protocolo:</u> 2mg/kg SID 28 dias PO (1ml/10kg dia)	Preço frasco 30ml = 84,82€ C.A.: $1ml \times 28 = 28ml$	84,82
20		Preço frasco 60ml = 155,36€ C.A.: $2ml \times 28 = 56ml$	155,36
30		Preço frasco 90ml = 212,82€ C.A.: $3ml \times 28 = 84ml$	212,82

ALOPURINOL			
Peso animal (kg)	Dados	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	<u>Protocolo:</u> 10mg/kg BID 180 dias PO  <u>Preço por comprimido:</u> 0,17€  Cada comprimido tem 300mg de substância ativa	$0,17 \times 1 \times 180$  C.A.: $10mg \times 2 \times 10kg = 200mg$ $\frac{200mg}{300mg} = 0,67$ <i>logo administra – se 1 comprimido</i>	30,60
20		$0,17 \times 1,5 \times 180$  C.A.: $10mg \times 2 \times 20kg = 400mg$ $\frac{400mg}{300mg} = 1,3$ <i>logo administra – se 1 comprimido e meio</i>	45,90
30		$0,17 \times 2 \times 180$  C.A.: $10mg \times 2 \times 30kg = 600mg$ $\frac{600mg}{300mg} = 2$ <i>logo administram – se 2 comprimidos</i>	61,20

Legenda: C.A., Cálculos Auxiliares

**Tabela 5** - Custo de tratamento combinado protocolo A (Glucantime + Alopurinol) e B (Milteforan + Alopurinol)

Peso animal (kg)	Item	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	A Glucantime + Alopurinol	71,76 + 30,60	102,36
	B Milteforan + Alopurinol	84,82 + 30,60	115,42
20	A Glucantime + Alopurinol	139,23 + 45,90	185,13
	B Milteforan + Alopurinol	155,36 + 45,90	201,26
30	A Glucantime + Alopurinol	214,20 + 61,20	275,40
	B Milteforan + Alopurinol	212,82 + 61,20	274,02

Os custos de tratamento incluíram também os **métodos de diagnóstico** (análises bioquímicas - hemograma, ALT, FAS, ureia/creatinina, urianálise, proteínasograma; o teste rápido Speed Leish K™ e método serológico de referência IFI), **seguimento clínico** (análises bioquímicas e IFI) e **recaídas**. Regra geral as recaídas ocorrem entre os 6 meses e os 2 anos após o final da terapêutica instituída. Assim, foi assumido que o animal apresenta recidivas de ano e meio a ano e meio, pelo que se consideram **3 recidivas**, e que morre ao final dos sete anos de idade. Nas recidivas considerou-se o mesmo protocolo terapêutico A (Glucantime + Alopurinol) ou B (Miltefosina + Alopurinol).

**Tabela 6** - Custos de diagnóstico e seguimento clínico

	Item	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
Diagnóstico	Análises bioquímicas + Speed Leish K <sup>TM</sup> + IFI	63,24 + 13,05 + 26,43	102,72
Seguimento clínico	Análises bioquímicas + IFI	63,24 + 26,43	89,67

**Tabela 7** - Custos de diagnóstico + tratamento durante 1ºano

Peso animal (kg)	Item	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	Diagnóstico + A + Consulta	102,72 + 102,36 + 28,70	233,78
	Diagnóstico + B + Consulta	102,72 + 115,42 + 28,70	246,84
20	Diagnóstico + A + Consulta	102,72 + 185,13 + 28,70	316,55
	Diagnóstico + B + Consulta	102,72 + 201,26 + 28,70	332,68
30	Diagnóstico + A + Consulta	102,72 + 275,40 + 28,70	406,82
	Diagnóstico + B + Consulta	102,72 + 274,02 + 28,70	405,44

**Tabela 8** - Custo de uma recidiva

Peso animal (kg)	Item	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	Custo Tratamento 1ºAno A + (2 × Seguimento clínico) + (2 × Consulta) + Análises Bioquímicas	102,36 + (2 × 89,67) + (2 × 28,70) + 63,24	402,34
	Custo Tratamento 1ºAno B + (2 × Seguimento clínico) + (2 × Consulta) + Análises Bioquímicas	115,42 + (2 × 89,67) + (2 × 28,70) + 63,24	415,40
20	Custo Tratamento 1ºAno A + (2 × Seguimento clínico) + (2 × Consulta) + Análises Bioquímicas	185,13 + (2 × 89,67) + (2 × 28,70) + 63,24	485,11
	Custo Tratamento 1ºAno B + (2 × Seguimento clínico) + (2 × Consulta) + Análises Bioquímicas	201,26 + (2 × 89,67) + (2 × 28,70) + 63,24	501,24
30	Custo Tratamento 1ºAno A + (2 × Seguimento clínico) + (2 × Consulta) + Análises Bioquímicas	275,40 + (2 × 89,67) + (2 × 28,70) + 63,24	575,38
	Custo Tratamento 1ºAno B + (2 × Seguimento clínico) + (2 × Consulta) + Análises Bioquímicas	274,02 + (2 × 89,67) + (2 × 28,70) + 63,24	574,00

Obs: Considerou-se que após 6 meses do tratamento realizaram-se análises bioquímicas, passado outros 6 meses realizou-se o seguimento clínico (análises bioquímicas + IFI) mais o custo de uma consulta e novamente passados 6 meses, efetuou-se outro seguimento clínico (análises bioquímicas + IFI) mais o custo da consulta.

**Tabela 9 - Custos de Tratamento Totais**

Peso animal (kg)	Item	Cálculos Intermédios	Custo total (€)
10	(Custo Diagnóstico + Tratamento 1ºAno A) + (Custo 3 Recidivas A)	$233,78 + (3 \times 402,34)$	1440,79
	(Custo Diagnóstico + Tratamento 1ºAno B) + (Custo 3 Recidivas B)	$246,84 + (3 \times 415,40)$	1493,04
20	(Custo Diagnóstico + Tratamento 1ºAno A) + (Custo 3 Recidivas A)	$316,55 + (3 \times 485,11)$	1771,88
	(Custo Diagnóstico + Tratamento 1ºAno B) + (Custo 3 Recidivas B)	$332,68 + (3 \times 501,24)$	1836,40
30	(Custo Diagnóstico + Tratamento 1ºAno A) + (Custo 3 Recidivas A)	$406,82 + (3 \times 575,38)$	2132,96
	(Custo Diagnóstico + Tratamento 1ºAno B) + (Custo 3 Recidivas B)	$405,44 + (3 \times 574,00)$	2127,44

**Tabela 10 - Rácio Custos Tratamento *versus* Custos Vacinação**

Peso animal (kg)	Item	1ºAno	Total
10	Custos Tratamento A/ Custos Vacinação	$\frac{233,78}{148,05} = 1,58$	$\frac{1440,79}{508,05} = 2,84$
	Custos Tratamento B/ Custos Vacinação	$\frac{246,84}{148,05} = 1,67$	$\frac{1493,04}{508,05} = 2,94$
20	Custos Tratamento A/ Custos Vacinação	$\frac{316,55}{148,05} = 2,14$	$\frac{1771,88}{508,05} = 3,49$
	Custos Tratamento B/ Custos Vacinação	$\frac{332,68}{148,05} = 2,25$	$\frac{1836,40}{508,05} = 3,61$
30	Custos Tratamento A/ Custos Vacinação	$\frac{406,82}{148,05} = 2,75$	$\frac{2132,96}{508,05} = 4,20$
	Custos Tratamento B/ Custos Vacinação	$\frac{405,44}{148,05} = 2,74$	$\frac{2127,44}{508,05} = 4,19$

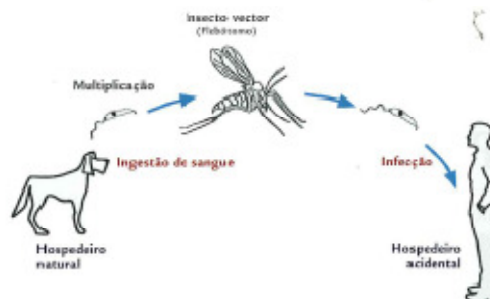
# LEISHMANIOSE

www.virbac.pt

LEISHMANIOSE / INFORMAÇÃO AO PROPRIETÁRIO / EDIÇÃO PORTUGAL

## Uma doença comum ao homem!

O cão é o hospedeiro natural mas a leishmaniose pode afectar também humanos (p. ex.: crianças, idosos ou indivíduos imunodeprimidos). Em Portugal foram diagnosticados 173 casos em humanos pelo IHMT, havendo no entanto uma sub-notificação destes casos<sup>1</sup>.



Adaptado de Ross M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. *Diagnosis and treatment*. QCAR (2006); 15(1): 39-52.

<sup>1</sup> L. CAMPINO et al, *Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal*, Acta Med Port. 2010; 23(5):859-864

Estudo realizado entre 2000 e 2009.

## Uma doença mortal!

Os casos de doença, se não forem tratados, podem ser fatais. Os tratamentos permitem controlar os sintomas mas não curam a doença. São no entanto muito dispendiosos, em média 4 a 5 vezes mais caros que a vacinação<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> A.I.L. CASTANHEIRA et al, *Pharmaco economics: A cost analysis between treatment and vaccination of canine leishmaniasis*

## A vacinação já é possível!

Um método simples que necessita apenas de uma revacinação anual para manter os níveis de resistência do seu cão contra a leishmaniose canina durante um ano completo. O início do programa de vacinação no primeiro ano inclui três injeções administradas com três semanas de intervalo.



Fale com o seu médico Veterinário.  
Quanto mais cedo melhor!

**Virbac**  
SAÚDE ANIMAL

A saúde animal é a nossa paixão

Mitindo de cultura da Leishmaniose, sob licença do IRIS.